

**Untersuchungen zur Regulation des Lipidstoffwechsels in
*Saccharomyces cerevisiae***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Jörg Urban

geb. am 29. März 1968 in Hoyerswerda

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
2. Prof. Dr. Ralf Erdmann
3. Prof. Dr. Enno Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2001

Zusammenfassung

Scs2p ist ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER), dessen Deletion zu einer geringeren Expression der Inositol-1-P Synthase *INO1* in Inositol-freiem Medium führt und dessen Überexpression die Inositol-Auxotrophie eines Stammes mit einer defekten „unfolded protein response“ supprimiert. *scs2* Mutanten weisen zudem eine erhöhte Sensitivität gegen Tunicamycin auf, eine Substanz, welche die N-Glykosylierung von Proteinen im ER inhibiert. Für die mutmaßlichen Orthologen von Scs2p in höheren Eukaryoten wurde eine Funktion dieser Proteine im vesikulären Transport postuliert.

In dieser Arbeit wurde Scs2p als mit Cue1p, einer Komponente der ER-assoziierten Proteindegradation, quervernetzbares Protein identifiziert, und daraufhin begonnen, die Funktion von Scs2p näher zu charakterisieren.

Eine Deletion von *SCS2* hatte keinen Einfluß auf die bekannten Cue1p-abhängigen Degradationswege. Auch die Induktion der „unfolded protein response“ (UPR) infolge einer Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen wurde durch eine Deletion von *SCS2* nicht beeinträchtigt. Eine Beeinträchtigung des Transportes durch den sekretorischen Weg konnte in *scs2* Hefen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

scs2 Mutanten zeigten eine generell verminderte Expression von Genen der Glycerolipid Biosynthese, deren Transkription über Ino2p/Ino4p reguliert wird. Dabei beeinträchtigte eine Deletion von *SCS2* nicht die Induktion der UPR in Inositol-armem Medium und die darüber vermittelte Induktion der *INO1* Expression. Ein analoger Phänotyp wurde auch in Mutanten beobachtet, in denen die Gene von Ubc7p, einer Komponente der ER-Degradation oder Lcb3p, einer Sphingosin-P Phosphatase, deletiert waren. Dabei bestand in bezug auf die Ino2p/Ino4p-abhängige Expressionsregulation keine epistatische Beziehung zwischen den drei Gendeletionen. Untersuchungen des Einflusses verschiedener Mutanten und Inhibitoren des Sphingolipid Stoffwechsels zeigten, daß Änderungen der Synthese von komplexen Sphingolipiden die Regulation der Inositol Synthase nur indirekt beeinflussten und gaben Hinweise auf eine Regulation des Glycerolipid Stoffwechsels durch Sphingosin.

scs2 Mutanten erwiesen sich als sensitiv gegen Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese. Untersuchungen von Stämmen, in denen verschiedene Gene der Sphingolipid Synthese deletiert wurden, sowie Analysen der Lipidzusammensetzung zeigten, daß in *scs2* Zellen eine Regulation beeinträchtigt ist, welche die IPC Synthase Aktivität bei einem verringerten Sphingolipid Gehalt der Zelle erhöht.

Die geringere Expression von Genen der Glycerolipid Synthese und die niedrigere Kapazität zur Synthese von komplexen Sphingolipiden erwiesen sich als voneinander unabhängige Auswirkungen eines komplexen Phänotyps von *scs2* Deletionsmutanten, wobei die primäre Funktion von Scs2p vermutlich nicht im Lipidstoffwechsel liegt.

Abstract

Scs2p is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum (ER), whose deletion leads to a reduced expression of *INO1* encoding inositol-1-phosphate synthase and whose over-expression suppresses the inositol auxotrophy of a strain with a defect unfolded protein response (UPR). *scs2* mutants display an enhanced sensitivity to Tunicamycin, an inhibitor of protein N-glycosylation in the ER. It has been proposed that the putative orthologs of Scs2p in higher eukaryotes function in vesicular transport.

In this work Scs2p, which was identified as a protein that can be crosslinked to Cue1p, a protein involved in ER-associated protein degradation, was further characterised.

A deletion of *SCS2* did not affect the known Cue1p-dependend degradation pathways. Cells lacking Scs2p normally induced the UPR upon an accumulation of misfolded proteins. An impairment of protein transport through the secretory pathway could also not be detected in *scs2* cells. *scs2* mutants displayed a generally reduced expression of genes involved in glycerolipid synthesis, whose transcription is regulated by Ino2p/Ino4p. The induction of the UPR in inositol-free medium and the subsequent upregulation of *INO1* expression were not impaired in these cells. A similar effect was observed in strains lacking Ubc7p, a component of the ER -associated protein degradation system and in cells lacking the sphingoid base-1-phosphate phosphatase Lcb3p. Regarding the Ino2p/Ino4p-dependend gene expression no epistatic relationship was observed between Scs2p, Ubc7p and Lcb3p. An examination of the influence of various mutants and inhibitors of the sphingolipid pathway indicated that alterations of the synthesis of complex sphingolipids have only an indirect influence on the regulation of inositol synthesis and pointed towards a control of glycerolipid synthesis by sphingoid bases.

scs2 cells were found to be sensitive to inhibitors of sphingolipid biosynthesis. The examination of strains lacking various enzymes involved in sphingolipid synthesis and direct analysis of lipid composition showed that a deletion of *SCS2* impairs an upregulation of IPC synthase activity under conditions where the sphingolipid content of the cell is diminished.

The reduced expression of genes involved in glycerolipid synthesis and the lower capacity for the synthesis of complex sphingolipids turned out to be mutually independent consequences of the complex phenotype of cells lacking Scs2p, whose primary function may not be in the lipid metabolism.

Schlagworte: Glycerolipide, Sphingolipide, UPR, ER Degradation

Keywords: glycerolipids, sphingolipids, unfolded protein response, ER degradation

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	2
	Inhaltsverzeichnis	4
1	Einführung	8
1.1	Das Endoplasmatische Retikulum	8
1.2	Das ER-assoziierte Degradationssystem.....	8
1.3	Scs2p	9
1.4	Die „Unfolded Protein Response“	10
1.5	Lipidstoffwechsel	11
1.5.1	Der Lipidstoffwechsel der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.5.2	Glycerophospholipide	12
1.5.3	Sphingolipide	16
1.6	Zielstellung	20
2	Materialien und Methoden	21
2.1	Chemikalien und Medien.....	21
2.1.1	Allgemeine Chemikalien.....	21
2.1.2	Biochemikalien	21
2.1.3	Enzyme, Kits und chromatographische Materialien.....	21
2.1.4	Radiochemikalien	22
2.2	Molekulargenetische Methoden.....	22
2.2.1	DNA Techniken.....	22
2.2.1.1	Allgemeine Arbeitstechniken	22
2.2.1.2	Plasmidliste	23
2.2.2	Hefegenetik	24
2.2.2.1	Medien und allgemeine Methoden.....	24
2.2.2.2	Konstruktion von Deletionsmutanten	25
2.2.2.3	Stammliste.....	26
2.2.2.4	Wachstumstests auf Platten	28
2.2.2.5	Test auf das Überleben einer hohen Dosis von Tunicamycin	28
2.3	Proteinbiochemische Methoden	28
2.3.1	Allgemeine Methoden	28
2.3.2	Quervernetzungs Experimente.....	29
2.3.3	Untersuchungen von Scs2(Δ T)p.....	29
2.3.4	Reinigung von His ₆ -Scs2(Δ T)p aus Bakterienlysat.....	30
2.3.5	Antikörper	31

2.3.5.1	Affinitätsreinigung von Antikörpern	31
2.3.5.2	Präparation von Antikörpersäulen	31
2.3.6	Reinigung von Quervernetzungsprodukten von Cue1p	32
2.3.7	„pulse-chase“ Experimente	33
2.3.8	Untersuchung des Transportes von CPY und Gas1p durch den sekretorischen Weg.....	34
2.3.9	Messung der β -Galaktosidase Aktivität.....	35
2.4	Analyse von mRNA.....	35
2.4.1	Präparation von mRNA	35
2.4.2	„Northern blot“ Analyse	36
2.4.3	Messung der Expression von <i>INO1</i> und <i>OPI3</i> in Mutantenstämmen	37
2.4.4	Einfluß von Inhibitoren des Lipidstoffwechsels.....	37
2.5	Lipidanalytik.....	38
2.5.1	Allgemeine Techniken.....	38
2.5.2	Bestimmung des Gehalts an Sphingolipiden.....	39
2.5.3	Analyse der Stabilität von Sphingolipiden	39
2.5.4	Identifizierung der verschiedenen Lipide.....	39
2.5.5	Bestimmung des Ceramidgehaltes	40
2.5.6	Analyse des Lipidtransports in <i>sec18-1</i> Stämmen.....	40
2.5.7	Analyse der Zusammensetzung von GPI-Ankern.....	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Reinigung eines Kopplungsproduktes von Cue1p.....	43
3.1.1	Vorversuche	43
3.1.2	Identifizierung von Scs2p als Quervernetzungspartner von Cue1p.....	43
3.2	Auswirkungen einer Deletion von <i>SCS2</i> auf die Cue1p-abhängige Proteindegradation am ER.....	45
3.3	Die „Unfolded Protein Response“ ist in <i>scs2</i> Zellen nicht beeinträchtigt	47
3.4	Notwendigkeit der Membranlokalisation von Scs2p für dessen Funktionalität.....	48
3.5	Der Proteintransport durch den sekretorischen Weg ist in <i>scs2</i> Stämmen nicht beeinträchtigt.....	50
3.6	Die Einflüsse von Scs2p, UPR und ER-Degradation auf die Regulation des Glycerolipidstoffwechsels.....	51
3.6.1	Mutationen in <i>SCS2</i> , UPR und <i>CUE1/UBC7</i> bewirken additiv eine Inositol-Auxotrophie	51
3.6.2	Die Deletion der Gene <i>SCS2</i> , <i>HAC1</i> oder <i>UBC7</i> verringert die Expression von <i>INO1</i> und <i>OPI3</i>	51

3.7	Der Einfluß von Scs2p auf den Sphingolipidstoffwechsel	54
3.7.1	Die Deletion von SCS2 führt zu einer Sensitivität gegen Aureobasidin A	54
3.7.2	Der Einfluß des potentiellen Homologen von Scs2p	56
3.7.3	Deletionen von <i>HAC1</i> oder <i>UBC7</i> erhöhen nicht die Sensitivität gegen Aureobasidin A	57
3.7.4	Die Auswirkungen von Veränderungen im Sphingosin-Phosphat Stoffwechsel	57
3.7.5	<i>scs2</i> Mutanten sind sensitiv gegen Myriocin und Australifungin	61
3.7.6	Ein erhöhter Ceramid Gehalt komplementiert nicht den <i>scs2</i> Phänotyp	62
3.7.7	Der Einfluß von Hydroxylasen des Sphingolipid Stoffwechsels	64
3.7.8	Die Beziehung zwischen Sphingolipid- und Glycerolipid- Stoffwechsel.....	66
3.7.9	Die Auswirkungen eines Fehlens der Sphingolipid Hydrolase	67
3.7.10	Die Auswirkungen einer erhöhten Expression von Scs2p	68
3.8	Die Lipidzusammensetzung von <i>scs2</i> Zellen	70
3.8.1	Der Sphingolipidgehalt.....	70
3.8.2	Der Ceramidgehalt von <i>scs2</i> Zellen.....	73
3.8.3	Die Auswirkungen einer Deletion von SCS2 auf den Transport von Ceramid zwischen ER und Golgi Apparat.....	75
3.8.4	Der Einbau von Ceramid in GPI-geankerte Proteine ist in <i>scs2</i> Zellen nicht beeinträchtigt.....	77
4	Diskussion	80
4.1	Einfluß einer Deletion von SCS2 auf ER-Degradation, „Unfolded Protein Response“ und den vesikulären Transport durch den sekretorischen Weg	80
4.2	Die Regulation des Glycerolipid Stoffwechsels	81
4.3	Der Einfluß von Scs2p auf den Sphingolipid Stoffwechsel	83
4.4	Der Einfluß des Sphingolipid Stoffwechsels auf die Regulation der Glycerolipid Synthese	85
4.5	Zur Funktion von Scs2p	87
4.6	Überlegungen zur Untersuchung einer möglichen Steuerung des Glycerolipid Stoffwechsels durch Sphingosin.....	89
5	Literaturverzeichnis	92
6	Anhang	100
	Abkürzungsverzeichnis	100
	Danksagung	103
	Persönliche Daten	104
	Lebenslauf.....	104

Publikationen	104
Erklärung	105

1 Einführung

1.1 Das Endoplasmatische Retikulum

Eine der wesentlichen Neuerungen eukaryotischer gegenüber prokaryotischen Zellen ist die Entwicklung spezieller Membranen mit stark unterschiedlicher Lipidzusammensetzung und dementsprechend abweichenden biophysikalischen Eigenschaften. Dies sind insbesondere die innere Mitochondrienmembran, über die der elektrochemische Gradient für die respiratorische ATP Synthese gebildet wird, die Plasmamembran, die die Abgeschlossenheit der Zelle nach außen gewährleistet, und die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Letztere bildet ein Kompartiment, das (abgesehen von weiteren Aufgaben wie z.B. der Bildung der Kernmembran) für zwei zentrale zelluläre Funktionen verantwortlich ist. Zum einen erfolgt hier die Translokation, Modifikation, Faltung und Assemblierung von Proteinen, die für den sekretorischen Weg bestimmt sind. Zum anderen ist der Hauptteil der Synthese von Glycerolipiden und Steroiden sowie die Synthese der Vorstufen komplexer Sphingolipide am ER und in damit assoziierten Lipidkörpern lokalisiert. Das Endoplasmatische Retikulum ermöglicht der Zelle, die Translokation und Reifung von Proteinen, die für die Plasmamembran und den extrazellulären Raum bestimmt sind, in einem internen Kompartiment ablaufen zu lassen. Auf diese Weise können Eukaryoten eine dickere und weniger permeable Außenmembran aufrechterhalten, die von einer Vielzahl von Funktionen befreit wird, und größere Zellen mit einem geringeren Verhältnis der Oberfläche zum Volumen bilden. Zwischen ER und Plasmamembran befinden sich der Golgi Apparat und das endosomale System, in denen durch Lipidstoffwechsel und gerichtete Transportprozesse die Lipidzusammensetzung der Membran verändert wird, während gleichzeitig Proteine modifiziert und sortiert werden. Angesichts der hohen Transportrate des sekretorischen Weges und des dynamischen Charakters einzelner Kompartimente ist eine komplizierte und koordinierte Regulation der protein- und lipidseitigen Prozesse erforderlich, damit die Zelle auf wechselnde Wachstumsbedingungen und Stresssituationen reagieren kann. Ohne eine genaue Kenntnis des Stoffwechsels der beteiligten Lipide lässt sich daher kein grundlegendes Verständnis der Funktionsweise des sekretorischen Weges gewinnen.

1.2 Das ER-assoziierte Degradationssystem

Ausgangspunkt dieser Arbeit war das Interesse unserer Arbeitsgruppe an der sogenannten ER-assoziierten Protein Degradation (ERAD). Um seine Funktionsfähigkeit unter Stressbedingungen aufrechtzuerhalten, besitzt das Endoplasmatische Retikulum eine Qualitätskontrolle, welche die korrekte Reifung von Proteinen überwacht. Diese erkennt

falsch gefaltete oder nicht assemblierte Proteine und hält sie im ER zurück. Sofern sich diese Proteine nicht in eine korrekte Form bringen lassen, werden sie degradiert. Zu diesem Zweck verfügt das ER über ein eigenes Degradationssystem, mit dem sowohl lumenale als auch integrale Membranproteine abgebaut werden können (Bonifacino und Weissman, 1998).

Kennzeichnend für dieses Abbausystem ist dessen Abhängigkeit von Ubiquitin konjugierenden Enzymen an der cytosolischen Seite der ER-Membran (in *S. cerevisiae* Ubc7p, Ubc6p und Ubc1p) (Biederer et al., 1996; Friedlander et al., 2000). Das für diese Arbeit wichtige Ubc7p bindet über ein integrales Membranprotein (Cue1p) an das ER und ist zusammen mit diesem notwendig für einen Großteil der Degradation von lumenalen und integralen Substraten. Darüber hinaus werden am endoplasmatischen Retikulum unter Beteiligung von Cue1p und Ubc7p auch cytosolische Substrate degradiert (Biederer et al., 1997; Chen et al., 1993). Anhand der Mitwirkung weiterer Proteine (Ubc6p, Hrd1p, Hrd3p, Der1p) (Hill und Cooper, 2000; Plemper und Wolf, 1999; Wilhovsky et al., 2000) lassen sich verschiedene Wege der ER-Degradation unterscheiden.

Bei der Suche nach potentiellen neuen Komponenten der ER-Degradation bzw. nach Funktionen dieses Abbauweges im Zusammenhang mit anderen Aufgaben des Endoplasmatischen Retikulums wurde Scs2p als mit Cue1p quervernetzbares Protein identifiziert und daraufhin begonnen, dieses Protein näher zu charakterisieren.

1.3 Scs2p

SCS2 wurde erstmals beschrieben als ein Gen, dessen verstärkte Expression es einem Stamm mit einer nicht näher charakterisierten dominanten Mutation (*CSE1*) ermöglicht, in einem Medium zu wachsen, daß Cholin, nicht aber Inositol enthält. *CSE1* Hefen werden Inositol-auxotroph, wenn dem Medium Cholin zugesetzt wird (SCS bedeutet daher: „suppressor of cholin sensitivity of *CSE1*“) (Nikawa et al., 1995). Die Überexpression von Scs2p suppressierte zudem die Inositol-Auxotrophie eines Stammes mit einem mutierten Allel von *HAC1*, einer Komponente der „unfolded protein response“ (siehe unten) (Nikawa et al., 1997). Das *SCS2* Gen erwies sich als nicht-essentiell. *scs2* Mutanten zeigten jedoch ein eingeschränktes Wachstum in Abwesenheit von Inositol. Dementsprechend war in Inositol-freiem Medium die Expression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der zellulären Inositol Synthese, der Inositol-1-P Synthase Ino1p, in *scs2* Zellen verringert (Nikawa et al., 1995) (siehe unten).

Bei der weiteren Charakterisierung wurde gezeigt, daß eine starke Überexpression von *SCS2* von einem „multi-copy“ Plasmid das Wachstum der Hefen beeinträchtigt. Antikörper gegen Scs2p erkannten im SDS-PAGE eine Bande von 35 kDa. Die Lokalisierung von Scs2p ergab, daß dieses über eine hydrophobe Aminosäuresequenz am C-Terminus in der ER-

Membran verankert ist, wobei sich der überwiegende Teil des Proteins an der cytosolischen Seite befindet (Kagiwada et al., 1998).

Der aminoterminal Bereich von Scs2p enthält einen Abschnitt von 16 Aminosäuren (37-52), der in einer Reihe eukaryotischer Proteine konserviert ist. Dazu gehören Vertreter in *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Aplysia californica* und *Homo sapiens* (Kagiwada et al., 1998; Nishimura et al., 1999; Weir et al., 1998). Bei den meisten dieser Proteine ist auch der C-terminale Membrananker vorhanden. Darüber hinaus besitzen sie nahe am C-Terminus eine als „coiled-coil“ Domäne bezeichnete Folge von Aminosäuren, die jedoch in Scs2p fehlt. Eine solche Sequenz findet man z.B. bei den sogenannten SNARE Proteinen, die an der Fusion von Vesikeln beteiligt sind. Sowohl für VAP-33, das Homologe von Scs2p in *Aplysia*, als auch für die beiden in Säugerzellen vorkommenden Varianten VAP-A und VAP-B ist eine Interaktion mit VAMP, einem v-SNARE, gezeigt worden (Nishimura et al., 1999; Skehel et al., 1995). Die Injektion von Antikörpern gegen mutmaßliche Homologe von Scs2p in verschiedene Zellen führte zu einer Beeinträchtigung unterschiedlicher Schritte des vesikulären Transportes (Skehel et al., 1995; Soussan et al., 1999). Im Gegensatz zu diesen Daten war in *scs2* Hefen der Transport eines sekretierten Proteins (Invertase, Suc2p) vom ER zur Plasmamembran unverändert (Kagiwada et al., 1998).

Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* enthält einen DNA Bereich (*ybl091c-a*), dessen translatierte Aminosäuresequenz eine Homologie zu *SCS2* aufweist (35% über 149 Aminosäuren). Dabei sind sowohl der konservierte Bereich von 16 Aminosäuren als auch der C-terminale Membrananker vorhanden. Die Sequenz enthält aber weder ein Startkodon in dem entsprechenden Leserahmen, noch wurden Hinweise auf das Vorhandensein eines Introns gefunden (Nikawa et al., 1995). Bei einer Analyse des gesamten Genoms auf Genexpression (SAGE) zeigte sich, daß dieser DNA-Bereich transkribiert wird (*Saccharomyces* Genome Database; SGD). Daher ist unklar, ob es sich hierbei um ein Pseudogen handelt oder ob durch eine Reifung des Transkriptes ein translatierbarer Leserahmen entsteht.

1.4 Die „Unfolded Protein Response“

Bei ihrer Charakterisierung von Scs2p (Kagiwada et al., 1998) erwähnten die Autoren auch, daß *scs2* Mutanten sensitiv gegen Tunicamycin (Tm) sind. Tm ist ein Inhibitor der Dolichol-P-(N-acetyl)glucosamin Synthase, der die N-Glykosylierung von Proteinen im ER verringert. Das führt, wie zum Beispiel auch eine Störung der Redoxbedingungen im ER durch DTT, zu einer Akkumulation falsch gefalteter Proteine im Lumen dieser Organelle.

Ein wichtiger Mechanismus zur Gewährleistung einer Toleranz des ER gegen derartige Streßbedingungen ist die sogenannte „unfolded protein response“ (UPR) (Chapman et al.,

1998; Mori, 2000). Damit bezeichnet man ein Signalsystem, das Streßbedingungen im ER erkennt und daraufhin die Synthese einer Reihe von Proteinen induziert. Darunter befinden sich verschiedene Chaperone des ER und Komponenten der ER-Degradation wie auch Enzyme, die an der Biosynthese von Lipiden beteiligt sind (Travers et al., 2000).

Die Hauptkomponenten dieses Systems in *S. cerevisiae* sind Ire1p, ein Transmembranprotein mit Kinase- und Ribonuklease-Aktivität, die tRNA-Ligase Rlg1p und der Transkriptionsfaktor Hac1p, der über die Bindung an eine UPRE („Unfolded Protein Response Element“) genannte DNA-Sequenz die Expression der Zielproteine steuert. Wenn Ire1p durch Streßbedingungen aktiviert wird, schneidet es aus dem 3' Bereich der *HAC1* mRNA (*HAC1-u*) ein 252 bp großes Intron heraus, woraufhin Rlg1p die verbliebenen Teile zu einer verkürzten mRNA (*HAC1-i*) ligiert. Dadurch verändert sich zum einen die Aminosäuresequenz, für welche die jeweiligen Transkripte kodieren, zum anderen blockiert die Intronsequenz die Translation der nicht prozessierten mRNA, so daß (*Hac1-u*)p nur in Spuren synthetisiert wird (Shamu, 1998).

Die Mechanismen der Aktivierung von Ire1p sind nicht genau charakterisiert. Die Bindung von Hsp70 (BiP, Kar2p) an die lumenale Domäne von Ire1p verhindert vermutlich die Dimerisierung und Selbstaktivierung dieses Sensorproteins. Als Folge einer Akkumulation falsch gefalteter Proteine im Lumen des ER verringert sich die Konzentration des für eine Bindung an Ire1p zur Verfügung stehenden nicht an falsch gefaltete Proteine gebundenen Kar2p, wodurch die „unfolded protein response“ ausgelöst wird (Okamura et al., 2000).

Neben den oben genannten Streßfaktoren aktiviert auch das Wachstum in Inositol-freiem Medium die UPR, wozu ebenfalls die Ire1p-abhängige Prozessierung der *HAC1* mRNA erforderlich ist (Cox et al., 1997). Das Wachstum in Inositol-freiem Medium führt möglicherweise zu einem geringeren Verhältnis von Phospholipid zu Protein und damit zu einer erhöhten Dichte des Endoplasmatischen Retikulums.

1.5 Lipidstoffwechsel

1.5.1 Der Lipidstoffwechsel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Da aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt war, daß die Regulation der Glycerophospholipid Biosynthese in Abwesenheit von Scs2p beeinträchtigt ist, wurde der Einfluß dieses Proteins auf den Lipidstoffwechsel näher charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, daß eine Deletion dieses Proteins auch die Synthese von Sphingolipiden beeinflusst.

Molekularbiologie und Biochemie des Lipidstoffwechsels von *Saccharomyces cerevisiae* sind vergleichsweise gut untersucht. Dies beruht unter anderem auf der einfachen gene-

tischen Manipulierbarkeit dieses Modellorganismus, der relativ geringen Komplexität regulatorischer Prozesse in einem unizellulären System und der unter Laborbedingungen großen Toleranz der Hefezellen gegenüber Änderungen ihrer Lipidzusammensetzung. So ist *S. cerevisiae* z.B. unter fermentativen Wachstumsbedingungen vergleichsweise tolerant gegen Störungen der mitochondrialen Lipidzusammensetzung (Daum et al., 1998). Bei dem Studium der Glycerophospholipide erweist es sich als Vorteil, daß eine defekte Regulation ihrer Synthese durch die Zugabe der Vorstufen Inositol oder Cholin zum Medium ausgeglichen werden kann.

Die Charakterisierung der Sphingolipid Biosynthese und der physiologischen Funktionen dieser Lipide wurde erst vor relativ kurzer Zeit begonnen. Dabei wurden viele der an dieser Synthese beteiligten Gene zuerst in *S. cerevisiae* beschrieben. Neben der Suche nach weiteren Komponenten sind die Kompartimentierung der Sphingolipidsynthese und die Regulation der Aktivität dieses Stoffwechselweges von Interesse für das Verständnis der Funktionsweise des sekretorischen Weges. Zudem spielen Zwischenprodukte dieses Syntheseweges eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion (Hannun und Luberto, 2000; van Meer und Holthuis, 2000). Die Arbeit in dem verhältnismäßig leicht manipulierbaren Hefesystem eröffnet die Möglichkeit, grundlegendes zellbiologisches Wissen über diese Klasse von Lipiden zu erlangen.

1.5.2 Glycerophospholipide

Glycerophospholipide bestehen aus dem lipophilen Molekülteil Diacylglycerol (DAG) und einer polaren Kopfgruppe, in der eine hydrophile Verbindung über einen Phosphodiester an die *sn*-3 Hydroxylgruppe des Glycerols gebunden ist. Die wichtigsten Verbindungen sind Phosphatidat (PA, DAG-P), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC). Darüber hinaus gibt es die vorwiegend in Mitochondrien-Membranen vorhandenen Lipide Phosphatidylglycerol-P (PG-P), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL). Die Zusammensetzung der Fettsäuren in Glycerolipiden der Hefe ist vorrangig C₁₆₋₁₈ bei einem hohen Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren in der *sn*-2 Position. Im Gegensatz zu tierischen Zellen enthalten Lipide von *S. cerevisiae* keine Alkylether. Der Anteil einzelner Glycerolipide variiert bei verschiedenen Wachstumsbedingungen stark. Insbesondere enthalten Hefen bei Zugabe einer hohen Menge Inositol (75µM) zum Medium wesentlich mehr PI (ca. 25%) als bei Wachstum in Inositol-freiem Medium (ca. 7,5%) (Kelley et al., 1988). Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Glycerolipid Stoffwechsels und seiner Beziehungen zur Sphingolipid Synthese. Eine allgemeine Einführung zum Lipidstoffwechsel in *S. cerevisiae* findet sich in (Daum et al., 1998).

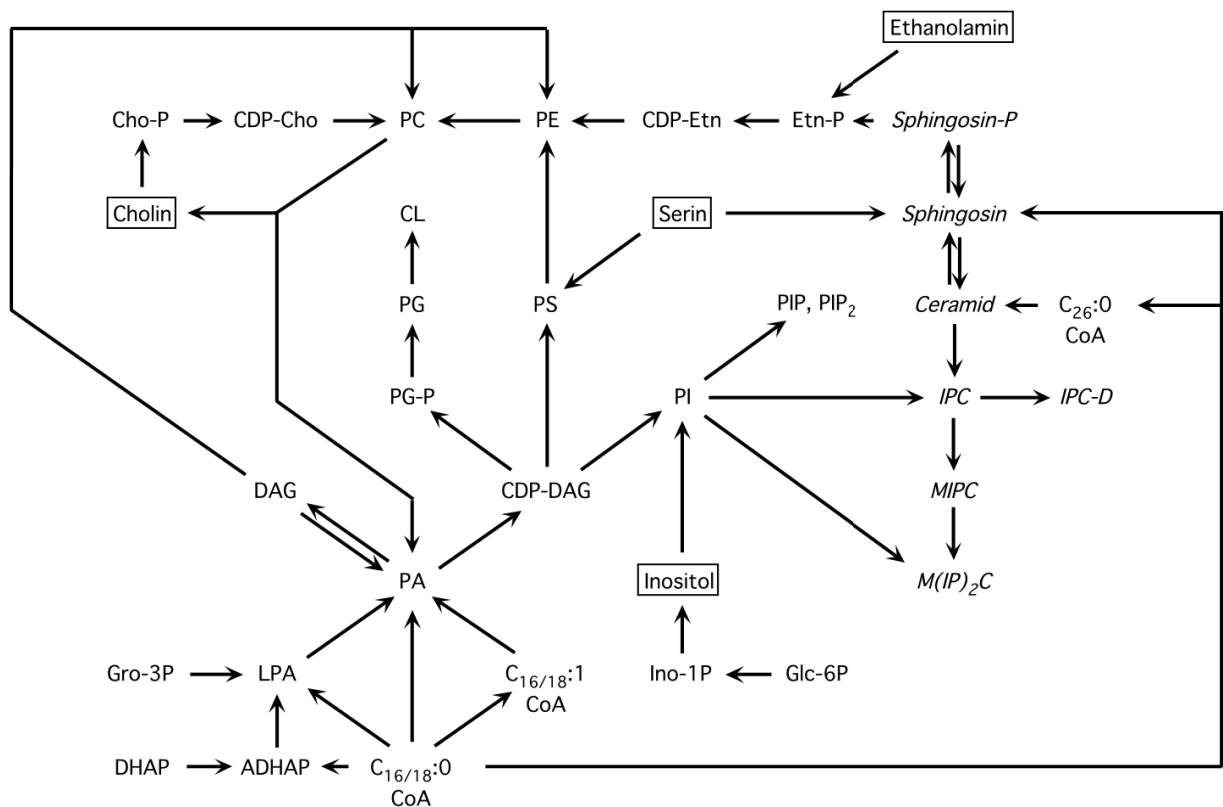


Abb. 1 Schematische Darstellung der Synthesewege von Glycero- und Sphingolipiden in *S. cerevisiae*.

Abkürzungen: siehe Text; ADHAP 1-Acyl-Dihydroxyaceton-Phosphat; Cho Cholin; Etn Ethanolamin; Gro Glycerol; Ino Inositol; LPA Lysophosphatidat; PIP, PIP₂ Phosphoinositide

Phosphatidat (PA; Diacylglycerol-Phosphat, DAG-P), das aus Glycerol-P oder Dihydroxyaceton-P und Acyl-CoA hergestellt wird, nimmt eine zentrale Position in der gesamten Glycerolipid Synthese ein. Konkurrierende Prozesse wandeln PA entweder in CDP-DAG, die Vorstufe des Hauptsyntheseweges, oder in DAG als Ausgangsstoff des sogenannten „Kennedy-Pathways“ um. Aus CDP-DAG werden in *S. cerevisiae* mit Inositol und Serin die beiden Produkte PI und PS hergestellt, wobei die Anteile dieser konkurrierenden Reaktionen durch die Verfügbarkeit von Inositol und eine komplexe Regulation der Expression und Enzymaktivität der PS Synthese bestimmt werden. PS wird anschließend durch Decarboxylierung in PE umgewandelt, aus dem durch Methylierung in zwei Schritten PC synthetisiert wird. In dem „Kennedy-Pathway“ werden Ethanolamin und Cholin phosphoryliert, in CDP-Ethanolamin bzw. CDP-Cholin umgewandelt und anschließend zur Synthese von PE bzw PC aus DAG verwendet. Cholin kann dabei aus der Hydrolyse von PC durch die im Golgi Apparat und endosomalen Kompartiment vorhandene Phospholipase D, Ethanolamin aus der Spaltung von Sphingosin-P durch die Sphingosin-P Lyase stammen. Außerdem können beide Substanzen aus dem Medium aufgenommen werden.

Der überwiegende Teil der Synthese von Phosphoglycerolipiden erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum oder damit assoziierten Lipidkörpern. Die Decarboxylierung von PS zu PE erfolgt vorwiegend im Mitochondrium, wo auch die Synthese der mitochondrialen Lipide stattfindet. Daneben spielt der Golgi Apparat eine bedeutende Rolle, in dem hohe spezifische Aktivitäten der PI Synthase und der DAG Cholin-Phosphotransferase, die PC über den „Kennedy-Pathway“ synthetisiert, gefunden wurden (Leber et al., 1995). In Golgi Apparat und endosomalem System befindet sich zudem ein zweites Isoenzym der PS Decarboxylase, das für einen kleineren Teil der zellulären PE Synthese verantwortlich zeichnet. Glycerolipide unterliegen einem ständigen Umbau, wofür außer der Phospholipase D im Golgi Apparat (Sreenivas et al., 1998) auch an der Plasmamembran lokalisierte Phospholipasen B verantwortlich sind (Lee et al., 1994; Merkel et al., 1999).

Die Biosynthese von Glycerolipiden wird in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Inositol und Cholin über die Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p reguliert (Henry und Patton-Vogt, 1998). Diese binden als Heterodimer an ein UAS INO genanntes Element in den Promotoren vieler am Stoffwechsel beteiligter Gene. Die Zugabe von Inositol ($>15\mu\text{M}$) zum Kulturmedium führt zu einer Repression der Transkription dieser Gene. Die zusätzliche Zugabe von Cholin verstärkt diese Repression, während ein Zusatz von Cholin allein ohne Effekt bleibt. Dabei wird die Expression des *INO1* Gens, welches für die Inositol-1-Phosphat Synthase kodiert, über einen weiten Bereich reguliert (50fach), während die meisten anderen Gene von Enzymen der Glycerolipid Synthese eine hohe basale Expression aufweisen und koordiniert um den Faktor 2-3 reguliert werden. Stellvertretend für letztere Gruppe wurde in dieser Arbeit die Genexpression der Phospholipid-N-Methyltransferase Opi3p analysiert.

Die Mechanismen der Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkriptionsregulation und die damit verbundenen Signaltransduktionswege sind nur teilweise bekannt. Es wird vermutet, daß die sogenannte Cholin-Repression von der Konzentration eines Zwischenmetabolites der Glycerolipid Biosynthese (z.B. PA oder DAG) abhängt (Griac und Henry, 1999). Die Inositol-Repression erfordert die Aufnahme von Inositol in die Zelle und beruht möglicherweise auf einer direkten Messung des PI Gehaltes der Zelle (Daum et al., 1998). Es wurde gezeigt, daß die Aktivierung eines Kinasekomplexes, der die Proteine Snf1p und Snf4p enthält (die Hefehomologen der AMP-abhängigen Kinase), für die Derepression der Inositol Synthese erforderlich ist. Ein Komplex der Phosphatase 1 (Glc7p) mit einer seiner regulatorischen Untereinheiten (Reg1p) deaktiviert den Snf1p/Snf4p-Komplex. In *reg1* Deletionsmutanten ist die Expression von Genen der Glycerolipid Biosynthese daher konstitutiv dereprimiert (Ouyang et al., 1999; Shirra und Arndt, 1999).

Außer von der Verfügbarkeit der Vorstufen Inositol und Cholin wird die Ino2p/Ino4p-abhängige Transkription auch von Wachstums- und Streßbedingungen beeinflusst.

So verändern sowohl die Wachstumsphase als auch die Wahl der Kohlenstoffquelle des Mediums (fermentatives oder respiratorisches Wachstum) die Lipidzusammensetzung der Zelle und den Grad der Aktivierung der über Ino2/Ino4p gesteuerten Genexpression (Daum et al., 1998). Eine Aktivierung der „unfolded protein response“ führt ebenfalls zu einer Aktivierung der Ino2p/Ino4p-abhängigen Expression, wobei das Wachstum in Inositol-freiem Medium an sich schon eine Streßbedingung darstellt, die zu einer Aktivierung der UPR führt (Cox et al., 1997).

Eine mögliche Erklärung der Wirkungsweise der Ino2p/Ino4p-abhängigen Regulation besteht darin, daß eine höhere Verfügbarkeit von Inositol (und unter bestimmten Bedingungen Cholin) zu einer insgesamt erhöhten Synthese von Glycerolipiden führt. Daher reprimiert die Zelle bei einer externen Zugabe von Inositol nicht nur die zelluläre Inositol Synthese, sondern reduziert auch die Proteinmenge von vielen weiteren an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzymen. Der Grund dafür dürfte in den Enzymeigenschaften der Proteine liegen, die Reaktionen an den beiden Hauptverzweigungspunkten des Glycerolipid Stoffwechsels ($\text{PA} \rightarrow \text{CDP-DAG} / \text{DAG}$ und $\text{CDP-DAG} \rightarrow \text{PI} / \text{PS}$) katalysieren. Eine Aktivierung der Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkription durch die UPR führt in einem solchen System sowohl zu einer höheren PI Konzentration in der Membran als auch zu einem höheren Phospholipidgehalt der Zelle, wobei möglicherweise beide Veränderungen helfen, Streßbedingungen im sekretorischen Weg zu reduzieren. Dabei könnte es eine Rolle spielen, daß PI ein Ausgangsprodukt für die Synthese von Phosphoinositiden ist, denen wiederum eine sehr wesentliche Funktion bei dem vesikulären Transport vom trans-Golgi zur Vakuole oder zur Plasmamembran zukommt (Odorizzi et al., 2000). Die Auswirkungen einer Zugabe von Inositol zum Medium auf das Verhältnis von Phospholipiden zu Proteinen in *S. cerevisiae* wurde jedoch noch nicht untersucht.

Abgesehen davon gibt es weitere Regulationsmechanismen des Glycerolipid Stoffwechsels. So ist vorgeschlagen worden, daß die zelluläre Konzentration an CTP die Synthese der zentralen Metabolite CDP-DAG, CDP-Ethanolamin und CDP-Cholin steuert, wobei die CTP Synthase von Proteinkinase C reguliert wird (Kent und Carman, 1999; Ostrander et al., 1998). Dies könnte ein Mechanismus für die Koordination von Wachstumsrate und Glycerolipid Biosynthese sein. Zudem beeinflußt das „Phospholipid Transfer Protein“ Sec14p, das am trans-Golgi lokalisiert ist, je nach gebundenem Lipid (PI bzw. PC) die Aktivität von Phospholipase D und „Kennedy-Pathway“ und steuert so das Verhältnis der beiden Lipide (Li et al., 2000).

1.5.3 Sphingolipide

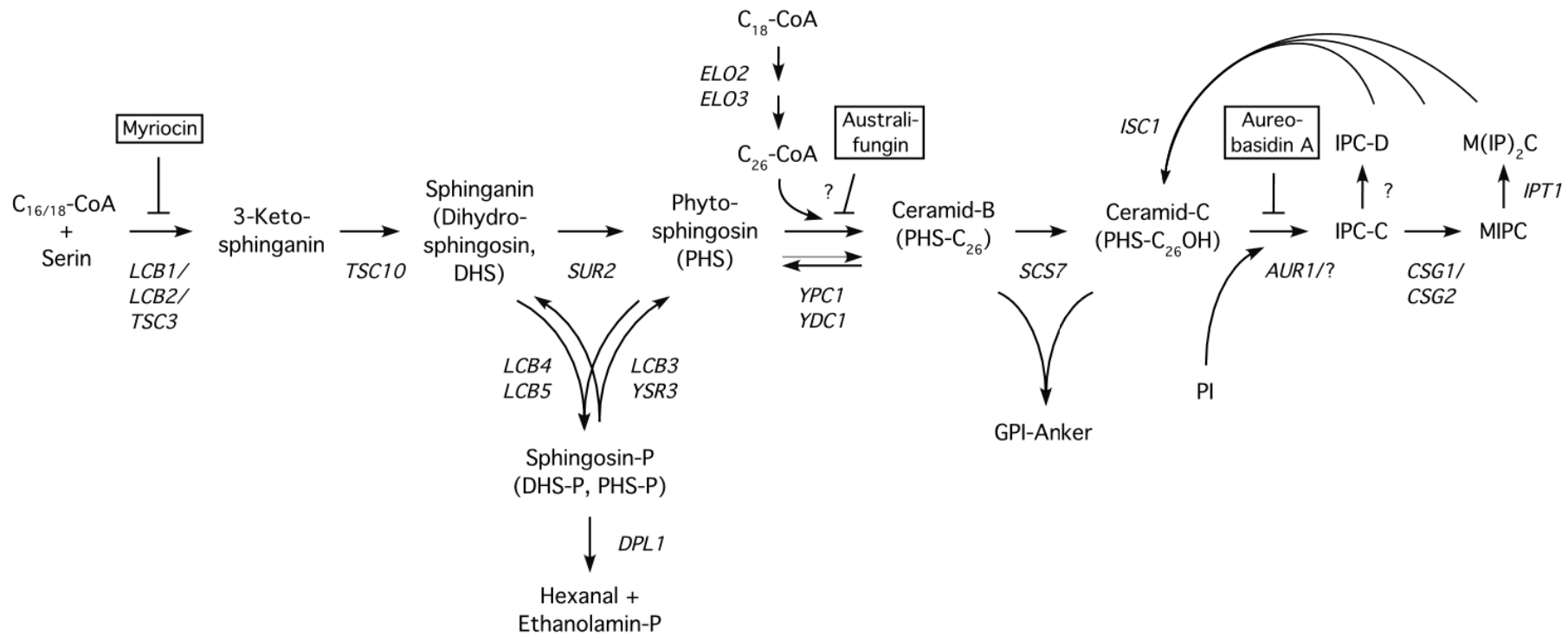
Abbildung 2 zeigt ein Schema des Sphingolipid Stoffwechsels in *S. cerevisiae* und nennt die derzeit bekannten Gene, deren Genprodukte an den einzelnen enzymatischen Reaktionen beteiligt sind, sowie den Wirkungsort einiger in dieser Arbeit verwendeter Inhibitoren. Zusammenfassende Darstellungen zu Sphingolipiden in Hefe finden sich in (Dickson und Lester, 1999; Schneiter, 1999).

Sphingolipide setzen sich ebenso wie Glycerolipide aus einem überwiegend hydrophoben Molekülteil (Ceramid) und einer polaren Kopfgruppe zusammen. Bei Pilzen wie bei einem Teil pflanzlicher Sphingolipide basiert diese auf Inositol-Phosphat. Ceramide bestehen aus einem Sphingosin („sphingoid base“), dessen Aminogruppe in *S. cerevisiae* mit einer C₂₆-Fettsäure acyliert ist.

Der erste Schritt der Sphingolipid Biosynthese ist die Reaktion von Palmitoyl- bzw. Stearoyl-CoA mit Serin zu 3-Ketosphinganin (Gable et al., 2000; Nagiec et al., 1994), welches anschließend zu Sphinganin (Dihydrosphingosin, DHS) reduziert wird (Beeler et al., 1998). Dieses wird zu 4-Hydroxy-Sphinganin (Phytosphingosin, PHS) hydroxyliert, auf dem die Sphingolipide von *S. cerevisiae* überwiegend basieren (Haak et al., 1997). Das ungesättigte tierische Sphingosin kommt in Hefen nicht vor.

Die Synthese von Ceramid erfolgt durch die Sphingosin-N-Acyltransferase, ein Enzym, das Hexacosyl-CoA (C₂₆-CoA) als Substrat verwendet und dessen Komponenten bisher nicht identifiziert werden konnten. In *S. cerevisiae* gibt es zwei Ceramidasen, die Ceramid zu Sphingosin und freien Fettsäuren hydrolysieren können, wobei sie eine leicht unterschiedliche Substratspezifität zeigen. Zumindest eines dieser Enzyme kann bei einem niedrigem Ceramidgehalt der Zelle auch die reverse Reaktion katalysieren (Mao et al., 2000a; Mao et al., 2000b). Ceramid wird in *S. cerevisiae* am C₂ der Acylgruppe hydroxyliert, wodurch das in komplexen Sphingolipiden vorrangig vorhandene Ceramid PHS-C₂₆OH (Cer-C) entsteht (Dunn et al., 1998).

Aus Ceramid wird durch Übertragung einer Inositol-phosphoryl Gruppe von PI das komplexe Sphingolipid Inositol-Phosphoryl-Ceramid (IPC, IPC-C) synthetisiert (Nagiec et al., 1997), das dann mittels Übertragung eines Moleküls Mannose zu MIPC (Beeler et al., 1997) und anschließend durch einen weiteren Transfer von Inositol-phosphat zu M(IP)₂C (Dickson et al., 1997b) weiter modifiziert wird. Über eine nicht näher charakterisierte Hydroxylierung, die durch Zugabe von Kupfer-Chelatoren zum Medium reduziert werden kann, entstehen die Nebenvarianten IPC-D und MIPC-D (Beeler et al., 1997).



<i>LCB1/LCB2/TSC3</i>	3-Ketosphinganine Synthase, Serin Palmitoyltransferase	?	Ceramid Synthase, Sphingosin N-acyl transferase
<i>TSC10</i>	3-Ketosphinganine Reduktase	<i>YPC1, YDC1</i>	Ceramidasen
<i>SUR2</i>	Sphinganine C_4 Hydroxylase	<i>SCS7</i>	Ceramid Hydroxylase
<i>LCB4, LCB5</i>	Sphingosin Kinasen	<i>AUR1</i>	Komponente der Ceramid Inositolphosphoryltransferase
<i>LCB3, YSR3</i>	Sphingosin-1-Phosphat Phosphatasen	<i>CSG1, CSG2</i>	notwendig für IPC Mannosyltransferase Aktivität
<i>DPL1</i>	Sphingosin-1-Phosphat Lyase	<i>IPT1</i>	MIPC Inositolphosphoryltransferase
<i>ELO2, ELO3</i>	Komponenten der Fettsäure Elongasen für $C_{18}...C_{26}$ -CoA	<i>ISC1</i>	Sphingolipid-spezifische Phospholipase C

Abb. 2 Darstellung des Sphingolipidstoffwechsels von *S. cerevisiae* sowie der Wirkorte von Inhibitoren verschiedener Schritte der Sphingolipidsynthese

Sphingosine können über eine Sphingosin Kinase in Sphingosin-P (DHS-P, PHS-P) metabolisiert werden (Nagiec et al., 1998), welches von einer Sphingosin-P Phosphatase wieder dephosphoryliert wird (Mao et al., 1999; Qie et al., 1997). Alternativ kann Sphingosin-P auch von einer Lyase in Hexanal (bzw. Hydroxy-Hexanal) und Ethanolamin-P gespalten werden, wobei letzteres zur Synthese von PE über den „Kennedy-Pathway“ verwendet wird (Saba et al., 1997). Unter normalen Wachstumsbedingungen wird ein erheblicher Teil des neu synthetisierten Sphingosins zu Aminoglycerolipiden statt zu Sphingolipiden metabolisiert. Dabei scheint der Sphingosin-P Phosphatase eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Ceramid Konzentration zuzukommen (Skrzypek et al., 1999).

Im Gegensatz zu der Situation in tierischen Zellen sind komplexe Sphingolipide in *S. cerevisiae* weitgehend stabil. Unmittelbar vor Abschluß dieser Arbeit wurde eine für Sphingolipide spezifische Phospholipase C beschrieben, die alle komplexen Sphingolipide hydrolysieren kann, jedoch vermutlich aufgrund ihrer Lokalisation (ER?) nur einen geringen Stoffumsatz bewirkt (Sawai et al., 2000).

Nur vier Reaktionsschritte in diesem gesamten Syntheseweg sind essentiell: Ketosphinganin Synthese, Reduktion von Ketosphinganin zu Sphinganin, Ceramid Synthese und IPC Synthese. Alle anderen Enzyme lassen sich deletieren, ohne daß unter Laborbedingungen ein Wachstumsphänotyp entsteht.

Die Synthese von Sphingosin und Ceramid erfolgt an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums. Dort sollen sich auch die Ceramidasen sowie Sphingosin-P Phosphatasen befinden und möglicherweise die Sphingolipase C (Dickson und Lester, 1999). Bis vor kurzem wurde angenommen, daß sich auch die IPC Synthase im ER befindet, während MIPC und M(IP)₂C im Golgi Apparat gebildet werden. Diese Annahme beruhte auf der Beobachtung, daß in *sec18-1* oder *sec23* Mutanten bei restriktiver Temperatur, wenn der ER-Golgi Transport blockiert ist, IPC synthetisiert wird, während die Synthese von MIPC oder M(IP)₂C stark verringert ist (Puoti et al., 1991). Es wurde jedoch gezeigt, daß sich auch die IPC Synthase im Golgi Apparat befindet und die Übertragung der Inositol-phosphoryl Gruppe vermutlich an der lumenalen Seite der Membran erfolgt (Levine et al., 2000). Der Transport von Ceramid zum Golgi könnte daher unabhängig von Sec18p und Sec23p erfolgen. Eine analoge Situation ist in tierischen Zellen beschrieben worden (van Meer und Holthuis, 2000). Die veränderte Lokalisierung der IPC Synthase beseitigt einen wesentlichen Unterschied zwischen Säuger- und Hefesystem und läßt vermuten, daß die Architektur des Sphingolipid Stoffwechsels relativ stark konserviert ist.

Die komplexen Sphingolipide befinden sich überwiegend in der Plasmamembran, wo sie 20-30% des Lipidanteils ausmachen (Schneiter, 1999). Sie binden an das ebenfalls dort konzentrierte Ergosterol, mit dem zusammen sie für die besonderen biophysikalischen Eigenschaften dieser Membran verantwortlich sind (Bagnat et al., 2000; van der Rest et al.,

1995). Eine Besonderheit der Lipidzusammensetzung von *S. cerevisiae* gegenüber tierischen Zellen ist, daß Sphingolipide ausschließlich sehr lange Fettsäuren (C₂₄-C₂₆) enthalten, diese hingegen in Glycerolipiden nicht oder nur in Spuren vorkommen. Daher sind Sphingolipide und Ergosterol für die Zunahme der Dicke der Membran vom ER (5nm) zur Plasmamembran (8nm) verantwortlich (Daum et al., 1998; Levine et al., 2000).

Einzelne Zwischenprodukte der Sphingolipid Biosynthese sind als Signalmoleküle oder Kofaktoren zellulärer Prozesse bedeutsam. Dies betrifft insbesondere Sphingosin (Endocytose) (Friant et al., 2000; Zanolari et al., 2000), Sphingosin-P (Temperaturresistenz) (Mao et al., 1999; Skrzypek et al., 1999), Ceramid (Zellzyklus) (Hannun, 1996) und IPC-C (Calcium Homöostase) (Beeler et al., 1997; Tanida et al., 1996).

Ceramid erfüllt zudem in *S. cerevisiae* eine weitere Funktion. Bei der Reifung von Proteinen mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker wird nach erfolgter Transacylierung der Polypeptidkette auf den Lipidanker der hydrophobe Anteil der Lipidkomponente modifiziert. Bei diesem „Remodelling“ genannten Prozeß wird entweder die Fettsäure in der *sn*-2 Position des Diacylglycerol Anteils durch einen längeren Acylrest (C₂₆) ersetzt oder das gesamte DAG gegen Ceramid ausgetauscht (Sipos et al., 1997).

Über die Regulation der Biosynthese von Sphingolipiden in *S. cerevisiae* ist nur wenig bekannt. Vermutlich können die Konzentrationen verschiedener Zwischenmetabolite unabhängig von der Regulation des Sphingolipidgehaltes verändert werden. So erhöht sich bei einem Erwärmen der Hefen von der normalen Wachstumstemperatur (25-30°C) auf 37°C die Konzentration von Sphingosin und Sphingosin-P vorübergehend stark, gefolgt von einer langsameren und langandauernden Erhöhung des Ceramid Spiegels. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit den Signalfunktionen dieser Substanzen (Wells et al., 1998). Im Gegensatz zum Glycerophospholipid Stoffwechsel erfolgt kaum eine Expressionsregulation der an der Sphingolipid Synthese beteiligten Enzyme (Dickson und Lester, 1999).

Mögliche Interaktionen zwischen Glycero- und Sphingolipid Stoffwechsel sind bisher kaum untersucht worden. Es ist bekannt, daß Zwischenprodukte der Sphingolipid Synthese die Enzymaktivität z.B. der PS Synthase beeinflussen können (Yamashita und Nikawa, 1997). Zudem führt eine Inhibition der Ceramid Synthase mit Fumonisin B₁ zu einer verminderten Synthese von Glycerolipiden (Wu et al., 1995). Dieser Effekt wurde bisher jedoch nicht näher charakterisiert.

1.6 Zielstellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Befund, daß Cue1p, eine Komponente der ER-assoziierten Proteindegradation, mit quervernetzenden Reagenzien an Scs2p gebunden werden kann und Scs2p somit möglicherweise einer der Hauptbindungspartner von Cue1p ist.

Scs2p war zuvor als ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums beschrieben worden, dessen Fehlen zu einer verringerten Expression von Genen der Glycerolipid Synthese führt. Zudem wiesen die Literaturdaten auf einen Einfluß dieses Proteins auf die „unfolded protein response“ (UPR) hin, da *scs2* Zellen sensitiv gegen Tunicamycin waren und eine Überexpression von *SCS2* die Inositol-Auxotrophie eines Stammes suppressierte, in dem eine Komponente der UPR (Hac1p) mutiert war.

Ziel der Dissertation war daher, den Einfluß von Scs2p auf ER-Degradation und „unfolded protein response“ zu analysieren sowie die Funktion von Scs2p im Rahmen der Lipidbiosynthese weitergehend zu charakterisieren und nach möglichen funktionellen Zusammenhängen zwischen dem Lipidstoffwechsel und den Systemen der ER-Degradation und der „unfolded protein response“ zu suchen.

In dieser Arbeit werden der Einfluß von Scs2p auf die Transkriptionsregulation der Glycerolipid Biosynthese näher charakterisiert und die Auswirkungen eines Fehlens dieses Proteins auf den Sphingolipid Stoffwechsel beschrieben. Zudem wird gezeigt, daß Mutationen in Komponenten der ER-Degradation und der Sphingolipid Synthese unabhängig von Scs2p die Transkriptionsregulation der Glycerolipid Biosynthese negativ beeinflussen. Die ER-assoziierte Proteindegradation und die „unfolded protein response“ werden hingegen durch eine Deletion von *SCS2* nicht beeinträchtigt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Medien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Standardchemikalien wie z.B. Salze, Puffersubstanzen, Zucker, Aminosäuren, Adenin, Uracil sowie Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographie wurden von Sigma, Fluka, Merck oder Roth bezogen. Die Methylamin-Lösung (33% in Ethanol) stammte von Fluka. „Yeast Nitrogene Base“, „Yeast extract“, Trypton und Pepton zur Präparation von Medien stammten von Difco. Vitamine und Spurenelemente für die Präparation von Inositol-freiem Medium wurden bei Sigma gekauft, ebenso wie Cholin und Inositol. Proteaseinhibitoren waren von Sigma und wurden folgendermaßen gelöst: Pepstatin A (20mg/ml DMSO), PMSF (100mM Isopropanol), TLCK (50mM Ethanol), TPCK (50mM Ethanol). Detergenzien wurden von Fluka (Triton X100, Brij58), Merck (Tween20), Roche (NP40) oder Calbiochem (Zwittergent 3-16, Digitonin (HPLC gereinigt)) bezogen. Vanadyl Ribonucleoside Complex wurde von Gibco und Methylene blue sowie Methyl-mannopyranosid von Sigma erworben. Quervernetzungsreagenzien stammten von Pierce (BMH) oder Sigma (DMP).

2.1.2 Biochemikalien

Ampicillin (Calbiochem, 50mg/ml H₂O)
Aureobasidin A (Takara, 1mg/ml Ethanol)
Australifungin (L. Koch (Merck), 1mg/ml Methanol)
Calcofluor (Fluorescent Brightener 28; Sigma, 10mg/ml H₂O)
Fumonisin B₁ (Calbiochem, 10mM Methanol)
Fumonisin B₂ (Calbiochem, 10mM Methanol)
Kaffein (Sigma, 200mM H₂O)
Myriocin (Sigma, 5mg/ml Methanol)
Phytosphingosin (Sigma, 10mM Methanol)
Tunicamycin (Calbiochem, 10mg/ml DMSO)

2.1.3 Enzyme, Kits und chromatographische Materialien

Restriktionsenzyme und T4 Ligase waren von Amersham oder New England Biolabs. Pfu Polymerase wurde von Stratagene und Taq Polymerase von Gibco oder Sigma bezogen. N-Glycosidase F und der „Hexanukleotid labelling kit“ stammten von Roche. Proteinase K

wurde bei Merck, Ribonuklease A bei Roth und DNase I bei Sigma erworben. Für die Reinigung von DNA Fragmenten wurde der „Qiaquick gel extraction kit“ (Qiagen) genutzt. Die Präparation von mRNA erfolgte mit Dynabeads M-280 Oligo(dT)₂₅ von Dynal. Zur Proteinreinigung wurden Protein A - und Protein G - Sepharose (Pharmacia), Ni-NTA - Agarose (Qiagen), Concanavalin A - Sepharose (Pharmacia) sowie Sulfo-link (Pierce) verwendet. Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce).

2.1.4 Radiochemikalien

[α - ³² P] dATP	NEN	9,25 MBq, 10mCi/ml
Pro-mix ([³⁵ S]-Met+Cys)	Amersham	265 MBq, 14mCi/ml
Phosphorus-33 (H ₃ ³³ PO ₄)	Amersham	37 MBq, 10mCi/ml
[u- ³ H]-Serin	NEN	37 MBq, 1mCi/ml
³ H-Inositol	Amersham	37 MBq, 1mCi/ml

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 DNA Techniken

2.2.1.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Die allgemeinen für die Arbeit mit DNA angewandten Methoden zur Amplifikation von DNA Fragmenten über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und zur Gewinnung von rekombinanter DNA finden sich in Methodensammlungen (Ausubel, 1988). Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in 1-2% Agarose in TAE Puffer, ihre anschließende Reinigung mit Hilfe des „Qiaquick gel extraction kit“ (Qiagen). Zur Dialyse des Ligationsansatzes dienten 25mm 0,025 μ m Dialysefilter (Millipore). *E.coli* (XL-1 blue) Zellen wurden über Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) transformiert, und bei 37°C in Luria Broth Medium (LB, 1% Trypton, 0,5% „Yeast extract“, 1% NaCl), supplementiert mit 50 μ g/ml Ampicillin, kultiviert. Zur Amplifikation von DNA für nachfolgende Klonierungen wurde Pfu Polymerase (Stratagene) verwendet. Dabei wurden mittels geeigneter PCR Primer neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt oder Aminosäuresequenzen verändert. Bei der Amplifikation kompletter Gene diente die Nähe zu den Start- bzw. Stop-kodons benachbarter Gene (Saccharomyces Genom Database, SGD) als Anhaltspunkt für die Wahl der Primer. Wo erforderlich, wurden die Konstrukte durch Sequenzierung überprüft (MWG Biotech). Zur Klonierung von Deletionskonstrukten für Hefegene wurden Standard *E.coli* Vektoren verwendet (BSK-KSII, pUC19). Die Expression von Proteinen in

S. cerevisiae erfolgte von Vektoren der pRS-Serie (Sikorski und Hieter, 1989) während die pQE-Serie (Qiagen) zur Expression in *E. coli* genutzt wurde.

2.2.1.2 Plasmidliste

Sequenzangaben für DNA beziehen sich auf das Startkodon des jeweiligen Gens (A = 1). Die für die Expression von Proteinen in Hefe verwendeten Plasmide existieren in der Zelle entweder in 1-2 (ARS/CEN-Plasmide; pRS41x, pRS317) oder in >10 Kopien (2 μ -Plasmide; pRS42x) bzw. werden in das Genom integriert (pRS30x; pRS40x). Die letzte Ziffer in der Bezeichnung von pRS Vektoren nennt das jeweilige zur Selektion verwendete Markergen (3 = HIS3, 4 = TRP1, 5 = LEU2, 6 = URA3, 7 = LYS2).

Name	Vektor; Insert	Kommentar
pCS135	pRS306; <i>ire1</i> (hintere + vordere Flanke)	kodierende Seq. von <i>IRE1</i> durch gesamtes Insertionsplasmid ersetzt (Cox et al., 1993)
pJU168	pRS406; <i>UBC7</i> ^{SER}	Punktmutation des aktiven Cysteins: C89S
pJU310	pRS416; <i>SS_{SUC2}-glyk-CUE1</i>	Cue1(glyk)p; MILQAFLFLLAGFAAKISAS↓ MTN ^{Glyk} ETSDRPLVHFTPA-Cue1p (1..203)
pJU315	pRS414; <i>SS_{SUC2}-glyk-CUE1</i>	siehe pJU310
pJU326	pQE30; <i>HIS₆-SCS2</i> (ΔT)	MRGS-H ₆ -Scs2p (2...219)-AKLD
pJU328	BSK; <i>scs2::TRP1</i>	Sequenz (-12...728) ersetzt durch <i>TRP1</i>
pJU329	BSK; <i>scs2::HIS3</i>	Sequenz (-12...728) ersetzt durch <i>HIS3</i>
pJU330	pRS317; <i>SCS2</i>	Sequenz: -998...949
pJU331	pRS317; <i>SCS2</i> (C48V)	Sequenz: -998...949, 142-144: GTA
pJU332	pRS317; <i>SCS2</i> (ΔT)	Scs2p (1...225)
pJU338	BSK; <i>hac1::TRP1</i>	Sequenz (25...930) ersetzt durch <i>TRP1</i>
pJU341	pRS405; <i>ire1</i> (hintere+ vordere Flanke)	kodierende Seq. von <i>IRE1</i> durch gesamtes Insertionsplasmid ersetzt
pJU342	pRS416; <i>SCS2</i>	Sequenz: -998...949
pJU343	pRS416; <i>SCS2</i> (C48V)	Sequenz: -998...949, 142-144: GTA
pJU344	pRS426; <i>SCS2</i>	Sequenz: -998...949
pJU350	pRS415; <i>HAC1</i>	Sequenz: -593...1450
pJU356	pRS415; 6xHA- <i>HAC1</i>	6x Hämagglutinin-Epitop in Spel (25) integriert
pJU362	pRS317; <i>SCS2</i> (C81V)	Sequenz: -998...949, 241-43: GTA
pJU363	pRS317; <i>SCS2</i> (C48V, C81V)	Sequenz: -998...949, 142-44, 241-43: GTA

Name	Vektor; Insert	Kommentar
pJU368	pQE60; <i>SCS2</i> (ΔT)	Scs2p (1...225, S2P)
pJU417	BSK; <i>ybl091c-a::LEU2</i>	Deletion einer Sequenz mit Homologie zu <i>SCS2</i>
pJU450	pRS415; <i>TRP1</i> , <i>HIS3</i>	<i>LEU2</i> , <i>TRP1</i> , <i>HIS3</i> ; siehe Abschnitt 2.2.2.1
pJU452	BSK; <i>scs7::TRP1</i>	Seq. (-11...1183) durch <i>TRP1</i> ersetzt
pJU454	BSK; <i>sur2::TRP1</i>	Seq. (239...479) durch <i>TRP1</i> ersetzt
pJU458	BSK; <i>ino2::TRP1</i>	Seq. (39...818) durch <i>TRP1</i> ersetzt
pJU466	BSK; <i>lcb4::TRP1</i>	Seq. (3...1104) durch <i>TRP1</i> ersetzt
pJU468	pRS426; <i>LCB4</i> (V2A, V3S)	Sequenz: -384...2158, NheI (4)
pJU473	BSK; <i>lcb3::LEU2</i>	Seq. (90...1297) durch <i>LEU2</i> ersetzt
pJU488	pUC19; <i>ino4::TRP1</i>	Seq. (92...409) durch <i>TRP1</i> ersetzt
pJU489	pRS415; <i>SCS2</i>	Sequenz: -998...949
pJU494	BSK; <i>dpl1::TRP1</i>	Seq. (51...1106) durch <i>TRP1</i> ersetzt
pJU496	BSK; <i>isc1::LEU2</i>	Seq. (429...968) durch <i>LEU2</i> ersetzt
pJU497	pRS426; <i>ISC1</i>	Sequenz: -205...1502
pUPRE	PLG- Δ 178; UPRE	Cyc1(UPRE) - lacZ; <i>URA3</i> , 2 μ
pYBRko	?; <i>ypc1::HIS3</i>	Konstrukt von E. Hartmann
pYLPGko	?; <i>ydc1::LEU2</i>	Konstrukt von E. Hartmann

2.2.2 Hefegenetik

2.2.2.1 Medien und allgemeine Methoden

Eine Beschreibung grundlegender Methoden der Hefegenetik findet sich in (Ausubel, 1988). Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit Plasmiden bzw. mit linearen DNA Fragmenten zur Deletion von Genen erfolgte über die Lithiumacetat Methode (Ausubel, 1988). Zur Selektion dienten die biochemischen Markergene *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* und *LYS2*, welche die Auxotrophie der verwendeten Stämme (s. Stammliste) für die entsprechenden Aminosäuren bzw. Nukleotidbasen Uracil, Histidin, Leucin, Tryptophan und Lysin komplementieren. Als Vollmedium diente YPD (2% Pepton, 1% „Yeast extract“, 2% Glucose, pH 5,5). Mit einer Ausnahme wurden alle Experimente in Minimalmedium SD, bestehend aus 6,7g/l „Yeast nitrogen base“ (YNB, Difco) und 2% Glucose durchgeführt, welches mit den für das Wachstum der jeweiligen Stämme erforderlichen Aminosäuren bzw. Nukleotidbasen

sowie weiteren Zugaben (Inositol, Cholin, NP40, Inhibitoren) supplementiert wurde. Medien für die Kultivierung der Hefen in Petrischalen enthielten zusätzlich 2% Agarose.

Da Medium aus kommerziellem YNB 11µM Inositol enthält, wurde für die Untersuchungen auf Inositol-Abhängigkeit aus den Reinsubstanzen entsprechend den Angaben des Herstellers ein Inositol-freies YNB hergestellt (Bezeichnung im Text: SD(-Ino)). Die Markierung von Zellen mit ^{33}P für Analysen der Lipidzusammensetzung erfolgte in einem Inositol-freien und Phosphat-reduzierten Minimalmedium, in dem 95% des K-Phosphats durch KCl ersetzt wurden (bezogen auf den Kaliumgehalt) (Bezeichnung im Text: SD(-Ino, 5% P)). Für ein Experiment, bei dem Zellen mit ^3H -Serin markiert wurden, wurde auch ein modifiziertes synthetisch komplettes Minimalmedium (SC) verwendet (Ausubel, 1988), das statt Serin 40mg/l Cystein, 200mg/l Alanin, 200mg/l Glycin, 40mg/l Prolin, 40mg/l Isoleucin und 100mg/l dTMP enthielt.

Da die Anwesenheit von Markergenen (*LEU2*) einen deutlichen Einfluß auf das allgemeine Wachstumsverhalten zeigte und Änderungen der Lipidzusammensetzung einen starken Einfluß auf die Aufnahme von Tryptophan hatten, wurden alle Versuche zum Lipidstoffwechsel mit Zellen durchgeführt, in denen mindestens je eine Kopie der Markergene *URA3*, *LEU2*, *HIS3* und *TRP1* vorhanden war. Dazu wurden die Hefen zuvor mit den Plasmiden pJU450 (*LEU2*, *HIS3*, *TRP1*) und pRS416/426 bzw. davon abgeleiteten Konstrukten (*URA3*) transformiert. Die zur Kultivierung verwendeten Medien waren dementsprechend SD +Lys (DF5 Stämme) bzw. SD +Ade (W303). Für Experimente mit Australifungin (ein Aldehyd, der mit Aminogruppen reagiert (Mandala und Harris, 2000)) wurden die Stämme zusätzlich mit pRS317 (*LYS2*) transformiert und wuchsen in SD ohne Zusatz von Aminosäuren. Bei allen Experimenten unter Zugabe von Inhibitoren bzw. Produkten des Lipidstoffwechsels enthielt das Medium 0,002-0,005% NP40, um eine effiziente Aufnahme der Substanzen zu erreichen. Bei Experimenten mit Stämmen, in denen die Gene der Transkriptionsfaktoren Ino2p oder Ino4p deletiert sind, wurde dem Medium 1mM Cholin zugesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wuchsen die Hefen bei 30°C.

2.2.2.2 Konstruktion von Deletionsmutanten

Die Deletion einzelner Hefegene erfolgte durch doppelte homologe Rekombination. Dazu wurde die DNA des betreffenden Gens über PCR amplifiziert, in *E. coli* Vektoren kloniert und ein Teil der kodierenden Sequenz (siehe Plasmidliste) durch ein Markergen ersetzt. Anschließend wurde ein linearisiertes Fragment mit zu dem entsprechenden Gen homologen Flanken in die Hefe transformiert und auf die Anwesenheit des Markergens selektiert. Die korrekte Insertion in die genomische DNA wurde mittels PCR überprüft. In einem Fall (*ire1*) wurde der gesamte Genbereich über doppelte homologe Rekombination durch ein Insertionsplasmid ersetzt.

Durch Kreuzung von Hefen verschiedenen Paarungstyps, Sporulation, Tetradendisektion und Analyse der Markerverteilung in den einzelnen Tetraden wurden verschiedene Gen-deletionen miteinander kombiniert.

2.2.2.3 Stammliste

Für die vorliegende Arbeit wurden, wo nicht anders vermerkt, haploide Stämme verwendet, die, abgesehen von den indizierten Genveränderungen, isogen zum DF5 Wildtyp sind (haploide Wildtypstämme: YWO1 und YWO2). Gelegentlich wurden zum Vergleich auch Stämme genutzt, die auf dem W303 Genotyp basieren.

Stamm	Genotyp	Konstruktion; Wildtyp
YWO1	<i>matα; trp1, his3, ura3, lys2, leu2</i>	DF5
YWO2	<i>matα; trp1, his3, ura3, lys2, leu2</i>	DF5
K699	<i>matα; ade2, trp1, leu2, his3, ura3, can1, ssd1-d</i>	W303-1a
YTX48	<i>matα; sec18-1, leu2, trp1</i>	(Novick et al., 1980), wt?
YTX106	<i>matα; ubc7::LEU2</i>	(Biederer et al., 1997)
YTX107	<i>matα; ubc7::LEU2</i>	(Biederer et al., 1997)
YTX115	<i>matα; cue1::LEU2</i>	(Biederer et al., 1997)
YTX140	<i>matα; prc1-1</i>	CPY*; (Biederer et al., 1997)
YTX141	<i>matα; prc1-1, cue1::HIS3</i>	CPY*; (Biederer et al., 1997)
YTX145	<i>matα; ire1::URA3</i>	trafo YWO2 (pCS135)
YTX150	<i>matα; sec61-2</i>	(Biederer et al., 1996)
YJU39	<i>matα; prc1-1, UBC7^{SER}</i>	trafo YTX140 (pJU168)
YJU73	<i>matα; scs2::HIS3</i>	trafo YWO1 (pJU329)
YJU74	<i>matα; scs2::HIS3, ubc7::LEU2</i>	trafo YTX106 (pJU329)
YJU75	<i>matα; scs2::HIS3, cue1::LEU2</i>	trafo YTX115 (pJU329)
YJU76	<i>matα; prc1-1, scs2::HIS3</i>	trafo YTX140 (pJU329)
YJU78	<i>matα; prc1-1, scs2::HIS3, UBC7^{SER}</i>	trafo YJU39 (pJU329)
YJU79	<i>matα; scs2::HIS3, ire1::URA3</i>	trafo YTX145 (pJU329)
YJU80	<i>matα; sec61-2, scs2::HIS3</i>	trafo YTX150 (pJU329)
YJU82	<i>matα; hac1::TRP1</i>	trafo YWO1 (pJU338)
YJU83	<i>matα; hac1::TRP1, scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU338)
YJU84	<i>matα; sec61-2, cue1::LEU2</i>	trafo YTX150 (pTX118)
YJU85	<i>matα; ire1::LEU2</i>	trafo YWO1 (pJU341)
YJU86	<i>matα; ire1::LEU2, scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU341)
YJU87	<i>matα; ire1::LEU2, cue1::LEU2</i>	trafo YTX115 (pJU341)

Stamm	Genotyp	Konstruktion; Wildtyp
YJU117	<i>mata</i> ; <i>ybl091c-a::LEU2</i>	trafo YWO2 (pJU417)
YJU118	<i>mataα</i> ; <i>ybl091c-a::LEU2</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU417)
YJU119	<i>mata</i> ; <i>scs2::TRP1</i>	trafo K699 (pJU328); W303
YJU120	<i>mata</i> ; <i>scs2::TRP1</i>	trafo YWO2 (pJU328)
YJU143	<i>mata</i> ; <i>sur2::TRP1</i>	trafo YWO2 (pJU454)
YJU145	<i>mata</i> ; <i>scs7::TRP1</i>	trafo YWO2 (pJU452)
YJU147	<i>mataα</i> ; <i>sur2::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU143 (pJU329)
YJU150	<i>mata</i> ; <i>scs7::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU145 (pJU329)
YJU160	<i>mata</i> ; <i>hac1::TRP1</i> , <i>ubc7::LEU2</i>	YTX107 x YJU83
YJU161	<i>mata</i> ; <i>hac1::TRP1</i> , <i>ubc7::LEU2</i> , <i>scs2::HIS3</i>	YTX107 x YJU83
YJU177	<i>mataα</i> ; <i>ino2::TRP1</i>	trafo YWO1 (pJU458)
YJU178	<i>mataα</i> ; <i>ino2::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU458)
YJU179	<i>mata</i> ; <i>ino2::TRP1</i> , <i>ire1::URA3</i>	trafo YTX145 (pJU458)
YJU185	<i>mata</i> ; <i>lcb4::TRP1</i>	trafo YWO1 (pJU466)
YJU186	<i>mata</i> ; <i>lcb4::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU466)
YJU191	<i>mata</i> ; <i>lcb3::LEU2</i>	trafo YWO1 (pJU473)
YJU192	<i>mata</i> ; <i>lcb3::LEU2</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU473)
YJU193	<i>mata</i> ; <i>lcb3::LEU2</i> , <i>lcb4::TRP1</i>	trafo YJU185 (pJU473)
YJU194	<i>mata</i> ; <i>lcb3::LEU2</i> , <i>lcb4::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU186 (pJU473)
YJU195	<i>mata</i> ; <i>lcb3::LEU2</i> , <i>hac1::TRP1</i>	trafo YJU82 (pJU473)
YJU196	<i>mata</i> ; <i>lcb3::LEU2</i> , <i>hac1::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU83 (pJU473)
YJU209	<i>mata</i> ; <i>ypc1::HIS3</i>	trafo YWO1 (pYBRko)
YJU212	<i>mata</i> ; <i>ycd1::LEU2</i> , <i>scs2::TRP1</i>	trafo YJU119 (pYLPGko)
YJU213	<i>mata</i> ; <i>ypc1::HIS3</i> , <i>ycd1::LEU2</i>	YJU209 x YJU212
YJU214	<i>mata</i> ; <i>ypc1::HIS3</i> , <i>ycd1::LEU2</i> , <i>scs2::TRP1</i>	YJU209 x YJU212
YJU221	<i>mata</i> ; <i>ino4::TRP1</i>	trafo YWO1 (pJU488)
YJU222	<i>mata</i> ; <i>ino4::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU488)
YJU223	<i>mat</i> ; <i>scs7::TRP1</i> , <i>sur2::TRP1</i>	YJU145 x YJU150
YJU224	<i>mat</i> ; <i>scs7::TRP1</i> , <i>sur2::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	YJU145 x YJU150
YJU229	<i>mata</i> ; <i>sec18-1</i> , <i>scs2::TRP1</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i>	trafo YTX48 (pJU328)
YJU231	<i>mata</i> ; <i>dpl1::TRP1</i>	trafo YWO2 (pJU494)
YJU232	<i>mata</i> ; <i>dpl1::TRP1</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU494)
YJU233	<i>mata</i> ; <i>isc1::LEU2</i>	trafo YWO2 (pJU496)
YJU234	<i>mataα</i> ; <i>isc1::LEU2</i> , <i>scs2::HIS3</i>	trafo YJU73 (pJU496)
YJU235	<i>mataα</i> ; <i>isc1::LEU2</i> , <i>hac1::TRP1</i>	trafo YJU82 (pJU496)

Stamm	Genotyp	Konstruktion; Wildtyp
YJU236	<i>matα; isc1::LEU2, scs2::HIS3, hac1::TRP1</i>	trafo YJU83 (pJU496)

2.2.2.4 Wachstumstests auf Platten

Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme wurden über Nacht in SD (+ 75 μ M Inositol) mit den entsprechenden Aminosäuren bzw. Nukleotidbasen kultiviert. Bei Experimenten mit Inhibitoren enthielt dieses Medium außerdem 0,002 % NP40. Am folgenden Morgen wurden die Hefen in dem gleichen Medium auf eine einheitliche Dichte von 0,25 OD₆₀₀ verdünnt und nach weiteren 5 Stunden Wachstum auf die zu untersuchenden Agaroseplatten gestrichen. Die Platten wurden nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C mit einer Polaroidkamera fotografiert.

2.2.2.5 Test auf das Überleben einer hohen Dosis von Tunicamycin

Zellen der Stämme YWO1, YJU73, YJU82 und YJU83 wurden in SD⁺ (+ 75 μ M Inositol) bis zum Erreichen einer Dichte von 0,7 OD₆₀₀ kultiviert, in dem gleichen Medium auf 0,25 OD₆₀₀ verdünnt und 10 μ g/ml Tunicamycin zugesetzt. Nach weiteren 0, 1 und 2 h Inkubation bei 30°C wurden Proben entnommen, 1:1000 verdünnt (für die Stämme YJU82 und YJU83 nach 1 bzw. 2 h Inkubation: 1:20) und auf 2 Petrischalen (YPD) pro Wert jeweils je 100 μ l ausplattiert. Nach 48 h Inkubation wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien ausgezählt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Allgemeine Methoden

Für Protokolle zu Standardmethoden des proteinbiochemischen Arbeitens siehe (Coligan, 1995).

Hefezellen wurden über Nacht bei 30°C in Minimalmedium angezogen, auf eine einheitliche Dichte verdünnt und weiter bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Phase (0,5-1 OD₆₀₀, $\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (2min 1600xg), einmal mit Aufschlußpuffer gewaschen und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dort wurden sie in 100-200 μ l Aufschlußpuffer (50mM HEPES (pH 7,5), 10mM EDTA) + Proteaseinhibitoren (PI: 1mM PMSF, 20 μ M Pepstatin A) durch starkes Schütteln (2min 2200rpm) mit 0,4-0,6 mm Glaskugeln (Sigma) aufgeschlossen. Anschließend wurde mittels Zentrifugation die jeweils gewünschte Zellfraktion präpariert. Die Fällung von Proteinen erfolgte mit 10% Trichloressigsäure (TCA, 10min Eis, 5min 14000rpm 4°C), das Pellet wurde einmal mit kaltem Aceton gewaschen und in 2x Probenpuffer gelöst (15min 65°C).

Die Proteine wurden in 1-2x Probenpuffer aufgenommen (10min 50°C) und in 9-18% Polyacrylamid Gelen elektrophoretisch getrennt (SDS-PAGE, (Coligan, 1995)). Zum Größenvergleich diente der „prestained broad range protein marker“ von Biorad.

Bei „Western blot“ Experimenten wurden die Proteine anschließend aus dem Gel durch Elektrophorese („tank blotting“) auf PVDF Membranen (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Diese wurden mit 10% Milchpulver (Glücksklee) in TBT für 10min geblockt und mit dem primären (2h RT oder über Nacht 4°C) und dem sekundären (45min RT) Antikörper inkubiert (Antikörper jeweils in TBT + 5% Milchpulver, Waschschrirte: PBS + 0,2% Brij58). Als primäre Antikörper wurden verwendet: Anti-Cue1 (Biederer et al., 1997), Anti-Scs2, Anti-GFP (Molecular Probes), Anti-Ubc6 (Walter et al., 2001) und Anti-HA (12CA5). Sekundäre Antikörper waren: Anti-Rabbit POD bzw. Anti-Mouse POD (Sigma). Die Detektion erfolgte über Lumineszenz (ECL, Amersham) durch Exposition gegen Kodak AR Film oder mittels einer CCD Kamera (Lumiimager, Fuji).

Der Proteingehalt von Proben wurde mit Hilfe des „BCA Protein Assay Ki“ (Pierce) bestimmt.

2.3.2 Quervernetzungs Experimente

Die zu untersuchenden Stämme wurden in SD (+ 75µM Inositol) angezogen und in Aufschlußpuffer mit Glaskugeln zermahlen (s. oben). Diese wurden mit 4 Volumen 50mM HEPES (pH 7,5), 150mM NaCl, 250mM Sorbitol, 10mM EDTA verdünnt und von Zelltrümmern befreit (5min 400xg). Aus dem Überstand wurden Membranen zentrifugiert (10min 16000xg) und in Membranpuffer (MP: 20mM HEPES (pH 7,0), 150mM NaCl, 1mM EDTA) aufgenommen. Membranen aus 2 OD₆₀₀ Zellen in 20µl MP (1% DMSO) wurden mit oder ohne 50µM Bismaleimidohexan (BMH) für eine Stunde auf Eis inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10µl 3x Probenpuffer (+ 50mM DTT) gestoppt (10min RT). Anschließend wurden die Quervernetzungsprodukte über SDS-PAGE getrennt (15% PAA) und auf PVDF Membranen transferiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Anti-Cue1 und Anti-Scs2 Antikörpern.

2.3.3 Untersuchungen von Scs2(ΔT)p

YWO1 und YJU73 Zellen, jeweils transformiert mit den Plasmiden pRS317 oder pJU332, wurden in SD (-Lys) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. 5 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet und in 100µl Aufschlußpuffer (50mM Tris (pH 7,5), 10mM EDTA, 1mM PMSF, 20µg/ml Pepstatin A) mit Glaskugeln aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 200µl (50mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl, 250mM Sorbitol, 10mM EDTA, 1mM PMSF, 10µg/ml Pepstatin A) verdünnt und Zelltrümmer abzentrifugiert (5min, 2300rpm, 4°C). Der Überstand (200µl) wurde durch Ultra-

zentrifugation (20min, 75000rpm, 4°C, TLA 100.3, Beckman) in Membranen und Cytosol getrennt, die in 300µl 1x Probenpuffer bzw. 100µl 3x Probenpuffer aufgenommen wurden (10min 65°C).

E. coli XL1 Zellen, transformiert mit pJU368, wurden über Nacht bei 37°C in LB (50µg/ml Ampicillin) angezogen, im gleichen Medium verdünnt (0,6 OD₆₀₀) und die Expression von Scs2(ΔT)p induziert (1mM IPTG, 30min 37°C). 50µl dieser Kultur wurden mit 50µl 3x Probenpuffer gemischt, 5min auf 95°C erhitzt und die nicht solubilisierten Bestandteile abzentrifugiert.

Proben von Membranen oder Cytosol aus 0,1 OD₆₀₀ Hefezellen oder solubilierte Proteine aus 5µl *E. coli* Kultur wurden in 15% PAA-Gelen getrennt und im Immunoblot mit Anti-Scs2 Antikörpern analysiert.

2.3.4 Reinigung von His₆-Scs2(ΔT)p aus Bakterienlysate

Lysepuffer (LP):	50mM NaPhosphat (pH 8,0), 300mM NaCl, 10mM Imidazol
Waschpuffer (WP):	50mM NaPhosphat (pH 8,0), 300mM NaCl, 20mM Imidazol
Elutionspuffer (EP):	50mM NaPhosphat (pH 8,0), 300mM NaCl, 250mM Imidazol

2l LB-Medium (100µg/ml Ampicillin) wurden mit *E. coli* (XL1 blue, transformiert mit pJU326) inokuliert und die Expression des Proteins über Nacht induziert (0,5mM IPTG, 37°C). Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und zweimal gewaschen (200ml H₂O, 25ml LP; 7min 5000xg, 4°C). Das Naßgewicht betrug 8,5g. Die Zellen wurden in 15ml LP (+ 20mM βME, 1mg/ml Lysozym) verdaut (30min, Eisbad), mit Proteaseinhibitoren versetzt (1mM PMSF, 50µM TPCK, 100µM TLCK) und über Ultraschall aufgeschlossen (4x20 Impulse, 0,7sec, ~350 W). Der Zellaufschluß wurde mit Ribonuklease A (10µg/ml) und DNase I (5µg/ml) behandelt (15min, 0°C), Zelltrümmer abzentrifugiert (10min, 15000 rpm, 4°C, Sorvall, SS34) und der Überstand filtriert (Millipore, 0,45µm). 3ml Ni-NTA Gel wurden mit WP equilibriert und mit dem Lysat inkubiert (1h, 4°C). Das Material wurde in eine Säule überführt, gewaschen (3x 10ml WP, 1x70ml WP 1,5ml/min) und mit 5x 4ml EP eluiert. Eine Amidoschwarz-Färbung von Proben auf Nitrozellulose zeigte, daß sich das Protein überwiegend in der ersten Fraktion befand. Diese wurde gegen PBS dialysiert (Slide-a-lyser, Pierce, 10 kDa; 1x 250ml, 90min RT; 1x 800ml, 15h 4°C). Der Proteingehalt der Probe betrug 3mg/ml bei 4ml Endvolumen. Das gereinigte Protein wurde mit 1/4 Vol Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

Ein Teil des gereinigten His₆-Scs2(ΔT)p diente zum Immunisieren von Kaninchen, ein weiterer wurde an Sulfo-link (Pierce) gekoppelt und für die Affinitätsreinigung der Anti-Scs2 Antikörper verwendet (s. unten).

2.3.5 Antikörper

Bindungspuffer (BP)	50mM HEPES (pH 7,5), 10mM EDTA
Glycinpuffer (GP)	100mM Glycin (pH 2,2)
Waschpuffer (WP)	20mM Tris (pH 7,5), 500mM NaCl
TBT	50mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,1% Tween 20
Boratpuffer (BP)	200mM NaBorat (pH 9,2)

2.3.5.1 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Aus Bakterienextrakt gereinigtes Protein (HIS₆-Scs2(Δ T)p, 9mg Protein in 3,7ml 0,8x PBS, 20% Glycerol) wurde mit 200 μ l 1M HEPES (pH 7,5) und 80 μ l 0,5M EDTA versetzt und über Nacht bei RT an Sulfo-link (Pierce, 1ml Gel in 15ml Säule, äquilibriert in BP) gebunden. Anschließend wurde das Gel gewaschen und überschüssige reaktive Gruppen zerstört (10ml BP; 5ml BP + 0,2% β ME (15min, RT); 20ml GP; 20ml WP+ 0,05% NaN₃). Die Säule wurde bei 4°C gelagert.

Die Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Serum erfolgte über eine Peptidsäule (Cue1p) (Biederer et al., 1997) bzw. über an Säulenmaterial gekoppeltes Protein (Scs2p). Das Serum wurde mit 5mM EDTA und 1mM PMSF versetzt und filtriert (0,45 μ m) und über die vorgewaschene Säule (4x 5ml GP, 1x 50ml WP) gepumpt (RT, über Nacht, 1,5ml/min). Nach Waschen der Säule (1x 10ml, 1x40ml TBT; 1x 50ml WP) wurden die gebundenen Immunglobuline mit 4x 5ml GP (4°C) eluiert und die Fraktionen mit jeweils 357 μ l 1,5M Tris (pH 8,8) neutralisiert. Proteinhaltige Fraktionen (Test durch Amidoschwarz-Färbung von Proben auf Nitrozellulose) wurden vereinigt und die Säulen nach Waschen mit 20ml WP in WP + 0,05% NaN₃ aufbewahrt (4°C).

Die Antikörper dienten zur Präparation einer Affinitätssäule (siehe unten) oder wurden für „Western blot“ Analysen über eine Hydroxyapatitsäule aufkonzentriert. Dazu wurden 0,6g Hydroxyapatit (1,5 - 2,0 ml Gel) in Wasser aufgenommen und durch mehrfaches Aufschwemmen, Absetzenlassen und Dekantieren von Schwebstoffen befreit. Anschließend wurde das Material in eine Säule überführt, mit 30ml 10mM NaPhosphat (pH 7,2) äquilibriert und das Glycineluat zugegeben. Die gebundenen Antikörper wurden mit 10x 0,5ml 0,5M NaPhosphat (pH 7,5) eluiert, proteinhaltige Fraktionen (Amidoschwarz-Färbung von Proben auf Nitrozellulose) vereinigt, mit einem Volumen Glycerol gemischt und bei -20°C gelagert.

2.3.5.2 Präparation von Antikörpersäulen

1,5ml Protein A- und 0,8ml Protein G-Sepharose Gel wurden gewaschen (1x 5ml GP; 4x5ml WP) und mit dem Glycineluat (siehe oben) 2 h bei RT inkubiert. Dann wurde das Gel

in eine Säule überführt, mit Boratpuffer (BP, 50ml) gespült und die Antikörper an das Säulenmaterial gekoppelt (10mM Dimethylpimelimidat (DMP) frisch gelöst in 10ml BP, 20min, RT). Nach erneutem Waschen der Säule (20ml BP, 10ml WP, 5ml GP, 15ml WP+0,05% NaN₃) wurde diese bei 4°C aufbewahrt.

2.3.6 Reinigung von Quervernetzungsprodukten von Cue1p

Aufschlußpuffer (AP)	50mM HEPES (pH 8,0), 0,2M Sorbitol, 5mM MgCl ₂ , 1mM EGTA
Verdünnungspuffer (VP)	50mM HEPES (pH 7,4), 1,4M Sorbitol, 0,45M NaCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM EGTA
Crosslinkpuffer (XP)	20mM HEPES (pH 7,0), 0,25M Sorbitol, 0,8M NaCl, 10mM EDTA
Glycerolpuffer (GP)	20mM HEPES (pH 7,4), 0,5M NaCl, 1mM MgCl ₂ , 20% Glycerol
Solubilisierungspuffer (SP)	20mM HEPES (pH 7,4), 0,5M NaCl, 1mM MgCl ₂ , 10% Glycerol, 1% Triton X100
Elutionspuffer (EP)	100mM Glycin (pH 2,2), 0,15M NaCl, 0,5% Triton X100

Hefezellen, die eine glykosylierte Variante von Cue1p synthetisierten (YTX115 + pJU310/315), wurden in YPD angezogen (7,5l, 4,25 OD₆₀₀/ml, 30°C), geerntet (5min 3000rpm GS3 (Sorvall) 4°C) und zweimal mit H₂O (je 400ml) sowie einmal mit AP (200ml, 5min 5500rpm GS3 4°C) gewaschen. Das Naßgewicht betrug 97,5g. Die Zellen wurden in 250ml AP (+ 0,5mM PMSF, 10µg/ml Pepstatin A) resuspendiert, mit einer Glasmühle aufgeschlossen (Dynamill, 2x 3min) und mit 1/3 Vol VP gemischt. Anschließend wurden Zelltrümmer und Mitochondrien abzentrifugiert (5min 5000rpm, 20min 9000rpm: GS3 (Sorvall) 4°C) und aus dem Überstand Membranen pelletiert (60min 45000rpm 45Ti (Beckman) 4°C). Diese wurden in 200ml XP resuspendiert, mit „Crosslinker“ behandelt (0,2mM BMH, 60min Eis), und überschüssiges Reagenz durch Zugabe von 10mM DTT zerstört (20min Eis). Daraufhin wurden die Membranen mit deionisiertem Saponin gewaschen (5% Saponin, 0,8M NaCl, Volumen: 300ml, 90min Eis) und durch ein Glycerolkissen zentrifugiert (20ml GP; 45min 45000rpm 45Ti 4°C). Im nächsten Schritt wurden Membranproteine solubilisiert (70ml SP 1h Eis; 45min 45000rpm 45Ti 4°C) und filtriert (0,45µm).

Zur Reinigung von glykosylierten Proteinen wurden diese an ConA - Sepharose (Pharmacia, 8ml Gel äquilibriert in SP (+1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂, 0,5mM DTT)) gebunden (30min RT), das Säulenmaterial mit 120ml SP gewaschen und die Glykoproteine mit SP (+ 0,5M Methyl-mannopyranosid) eluiert (1x 50ml, 30min RT; 1x 50ml, 30min 37°C).

Im letzten Reinigungsschritt wurde das ConA-Eluat über eine Anti-Cue1p Affinitätssäule gepumpt (9h, 4°C, 1,5 ml/min), die Säule gewaschen (80ml SP) und mit 4ml EP eluiert. Das Eluat wurde mit 10% TCA gefällt, mit kaltem Aceton gewaschen und in SDS-PAGE Probenpuffer gelöst. Die Proteine wurden in einem 15% PAA Gel aufgetrennt. Die anschließende Coomassie-Färbung zeigte drei prominente Banden, deren Molekulargewichte denen des glykosylierten Cue1p und seiner beiden Quervernetzungs-Produkte entsprachen.

Aus dem Gelbereich der größten Bande wurden durch Behandlung mit Trypsin Peptide gewonnen und über „reversed phase“ HPLC aufgetrennt. Ausgewählte Peptide wurden über Edman Abbau ansequenziert (AG Proteinchemie des MDC). Durch einen Sequenzvergleich der dabei erhaltenen Aminosäurefolgen mit dem translatierten Genom von *S. cerevisiae* (SGD) wurden die entsprechenden Proteine identifiziert.

2.3.7 „pulse-chase“ Experimente

„chase“ Medium	SD ⁺ (0,75mM Met/Cys, 3,3mM (NH ₄) ₂ SO ₄)
Aufschlußpuffer (AP)	50mM Tris (pH 7,5), 10mM EDTA, 1mM PMSF, 20µg/ml Pepstatin A
Verdünnungspuffer (VP)	50mM Tris (pH 7,5), 165mM NaCl, 1,1% Triton X100, 0,11% SDS, 10µg/ml Pepstatin A
IP-Puffer	50mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl, 1% TX100, 0,1% SDS, 10µg/ml Pepstatin A

Zur Untersuchung der Stabilität von CPY* wurden Zellen verschiedener das *prc1-1* Allel enthaltender Stämme in SD⁺ (+ 75µM Inositol) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Dann wurden 10 OD₆₀₀ Zellen in 0,6ml Medium mit 165µCi [³⁵S]-Methionin/Cystein über 5min markiert, abzentrifugiert (20sec 10000rpm) und in 3,3ml „chase“-Medium (+ 75µM Inositol) in 50ml Falcon-Gefäße überführt. Nach 0, 30 und 60 min wurden Proben von 1ml genommen, mit 0,5ml 30mM NaN₃ gemischt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (20sec 10000rpm), in 75µl AP mit Glaskugeln aufgeschlossen, mit 925µl VP versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden Glaskugeln und nicht solubilisierete Bestandteile abzentrifugiert (2x 10min 16000xg 4°C) und aus dem Überstand über Nacht CPY* immunpräzipitiert (0,25µg Anti-CPY (Molecular Probes), 15µl Protein G - Sepharose). Die Sepharose wurde zweimal mit IP-Puffer und einmal mit IP-Puffer (0,02% SDS) gewaschen und mit 10µl N-Glycosidase F (40u/ml in IP-Puffer (0,02% SDS, 50mM βME)) für 1h bei 37°C inkubiert. Diese Deglykosylierung erfolgte, da eine zunehmende Verlängerung der Zuckerketten durch Enzyme des cis-Golgi bei späteren Zeitwerten zu einer Verbreiterung der Banden führt, wodurch ein schnellerer Abbau vorgetäuscht wird. Nach Zugabe von 6µl 3x PP (+150mM

DTT) und Erhitzen auf 50°C (10min) wurde die Sepharose abzentrifugiert und die Proben über SDS-PAGE getrennt (siehe unten).

Für die Untersuchung der Abbaukinetik des Sec61-2 Proteins wurden Zellen der Stämme YTX150, YJU80 und YJU84 in SD⁺ (+ 20µM Inositol) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Dann wurden 13 OD₆₀₀ Zellen in 1ml SD⁺+ 50µCi [³⁵S]-Methionin/Cystein für 10min bei 30°C markiert, pelletiert (20sec 10000rpm) und in 4,2ml „chase“-Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie im Wasserbad auf 38°C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur wurden nach weiteren 0, 1, 2 und 3 h Aliquots von 1ml entnommen, mit 10mM NaN₃ versetzt und auf Eis gelagert. Der Aufschluß mit Glaskugeln erfolgte in 100µl AP. Nach Zugabe weiterer 900µl AP wurden 900µl des Zellaufschlusses in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 20min bei 25000rpm zentrifugiert (TLA45 (Beckman)). Das Pellet wurde mit Ultraschall in 1ml IP-Puffer resuspendiert, 1h auf Eis inkubiert und das nicht solubilisierbare Material abzentrifugiert (2x 10min 16000xg 4°C). Sec61p wurde über Nacht aus dem Solubilisat immunpräzipitiert (Anti-Sec61 (Biederer et al., 1996), 15µl Protein A - Sepharose), die Sepharose zweimal mit IP-Puffer gewaschen und das gebundene Protein mit 15µl PP (+ 50mM DTT) eluiert (10min 50°C).

Die Proben wurden über SDS-PAGE (12% PAA) getrennt und die Proteingele 10min in 10% Essigsäure fixiert und unter Vakuum auf 3MM-Papier getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Exposition gegen BAS-MS Folien (Fuji), welche mit einem BAS 2000 Leser (Fuji) ausgelesen wurden. Zur Quantifizierung diente das Programm TINA 2.08.

2.3.8 Untersuchung des Transportes von CPY und Gas1p durch den sekretorischen Weg

Zellen der Stämme YWO1 und YJU73, transformiert mit pJU450 und pRS416, wurden in SD (+ Lys) bis zu einer Dichte von 0,5 OD₆₀₀ angezogen. Dann wurden je 20 OD₆₀₀ Zellen in 0,5ml SD (+ Lys) mit 300µCi [³⁵S]-Met+Cys 3min bei 30°C markiert, 100µl „chase mix“ (0,6 mg/ml Cycloheximid, je 6mM Met/Cys) zugegeben und die Kulturen weiter bei 30°C inkubiert. Nach 0, 2, 4, 10, 20 und 30 min wurden Proben von 100µl entnommen, 25µl (250mM Tris (pH 7,5), 50mM EDTA, 50mM NaF, 50mM NaN₃, 5mM PMSF, 100µg/ml Pepstatin A, 250 µg/ml Digitonin) zugegeben und die Zellen durch Schütteln mit Glaskugeln (2min 2200rpm) aufgeschlossen. Die Proben wurden mit 1ml (50mM Tris (pH 7,5), 165mM NaCl, 1,1% TX 100, 0,1% SDS) gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Glaskugeln und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (2x 10min 14000rpm 4°C) und aus dem Überstand CPY und Gas1p immunpräzipitiert (15µl Protein G - Sepharose, 1µl Anti-CPY + 1,5µl Anti-Gas1, über Nacht 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die gebundenen Proteine mit 1x Probenpuffer (+ 50mM DTT) eluiert (10min 50°C) und über SDS-PAGE (9% PAA)

aufgetrennt. Die Gele wurden 10min mit 10% Essigsäure fixiert, auf 3MM-Papier getrocknet und gegen BAS-MS Folien (Fuji) exponiert.

2.3.9 Messung der β -Galaktosidase Aktivität

Z-Puffer	100mM Na-Phosphat (pH7,0), 10mM KCl, 1mM MgSO ₄ ,
ONPG	Ortho-nitrophenyl-galactopyranosid (4mg/ml; 100mM K-Phosphat (pH 7,0))

Für die Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurden Zellen, die das pUPRE Testplasmid enthielten, über Nacht in SD(-Ino) (+ Lys, 0/75 μ M Inositol) angezogen und am folgenden Tag in frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Zu einem Teil der Kultur in mit Inositol supplementiertem Medium wurden 5mM DTT zugegeben. Nach weiteren 4h Wachstum wurde ca. 1 OD₆₀₀ Zellen abzentrifugiert, in 1,5ml Z-puffer + 100 μ g/ml Cycloheximid aufgenommen und die OD₆₀₀ der Zellsuspension bestimmt. Für die lacZ Messung wurden je Meßwert 2x 100 μ l Zellsuspension mit 0,9ml Z-Puffer (+ 55mM β ME, 55 μ g/ml Digitonin) gemischt und kurz bei 30°C vorinkubiert. Dann wurden 0,2ml ONPG zugegeben und der Ansatz weitere 30-240min bis zum Erreichen einer mittleren Farbtiefe bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5ml 1M Na₂CO₃ (pH 11) gestoppt, die Röhrchen 2min bei 16000 x g zentrifugiert und die OD₄₂₀ des Überstandes gemessen. Die Formel $1000 \cdot OD_{420} / OD_{600}$ ergab die Werte für die β -Galaktosidase Aktivität.

2.4 Analyse von mRNA

2.4.1 Präparation von mRNA

Alle Puffer wurden entweder über Nacht mit 0,1% DEPC behandelt und anschließend autoklaviert oder in mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt (10xMOPS).

RNase Inhibitor Puffer (RP)	50mM HEPES (pH 7,4), 100mM LiCl, 10mM Vanadyl Ribonucleoside Complex, 1% LiDS, 50 μ g/ml Digitonin
Lysepuffer (LP)	50mM HEPES (pH 7,4), 100mM LiCl, 10mM EDTA, 1% LiDS, 5mM DTT
Verdünnungspuffer (VP)	50mM HEPES (pH 7,4), 900mM LiCl, 10mM EDTA, 1% LiDS
Waschpuffer 1 (WP1)	10mM HEPES (pH 7,4), 150mM LiCl, 1mM EDTA, 0,1% LiDS
Waschpuffer 2 (WP2)	10mM HEPES (pH 7,4), 150mM LiCl, 1mM EDTA, 0,01% LiDS
10xMOPS	0,4M MOPS (pH 7,0), 0,1M NaAcetat, 10mM EDTA

1,25xFormamidpuffer	500µl Formamid, 160µl Formaldehyd (37%, deionisiert), 100µl 10xMOPS, 40µl H ₂ O
5xProbenpuffer (PB)	50% Glycerol, 1mM EDTA, 0,25% Bromphenol blau
Aufbewahrungspuffer (AP)	250mM HEPES (pH 7,4), 20mM EDTA, 0,1% Tween 20

Je 5 OD₆₀₀ Zellen wurden pelletiert (15ml Falcon, 1min 2500 x g, 4°C) und mit 0,5 ml RP in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt, erneut zentrifugiert (20sec, 10000rpm, 4°C) und das Pellet bei -80°C eingefroren.

RNA-Präparation: Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden die Zellen in 200µl LP durch 2min schütteln (2200rpm) mit Glaskugeln (0,4-0,6 mm) aufgeschlossen, mit 200µl VP versetzt und die wäßrige Lösung 2x mit 400µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1 extrahiert (30sec schütteln bei 2200rpm, 5min schütteln bei 65°C (Eppendorf-Schüttler), 2min 14000rpm RT) und 1x mit 300µl Chloroform extrahiert (30sec 2200rpm, 2min 14000rpm).

Anschließend wurde die wäßrige Phase mit Dynabeads M-280 Oligo(dT)₂₅ (Dyna) inkubiert (50µl Beads je Probe in 50µl LP/VP (1:1), 10min bei 30°C schütteln). Die Beads wurden dreimal gewaschen (2x WP1, 1x WP2, je 400µl), die gebundene mRNA mit 24µl 1,25x Formamidpuffer eluiert und die Proben mit 6µl PB versetzt. Die Magnetbeads wurden in mehreren Waschschritten regeneriert (1x 65°C (3min; 0,1M NaOH, 0,01% SDS); 2x RT (0,1M NaOH, 0,01% SDS); 2x RT (AP)) und in AP (+ 0,005% NaN₃) bei 4°C gelagert. Die dT₂₅-Beads wurden mehr als fünfmal wiederverwendet.

2.4.2 „Northern blot“ Analyse

Laufpuffer	1xMOPS, 6% Formaldehyd
10xSSC	0.15M NaCitrat (pH 7,0), 1,5M NaCl
Methylenblau-Lösung	0,03% Methylenblau, 0,3M NaAcetat (pH 5,2)
50xDenhardt	10g/l Ficoll 400, 10g/l Polyvinylpyrrolidone, 10g/l BSA
Hybridisierungslösung	50% Formamid, 5xSSC, 5xDenhardt, 25mM K-Phosphat (pH 7,4), 50µg/ml ‚Hering sperm DNA‘

Elektrophorese/ „Northern blot“: Die mRNA wurde 3min auf 85°C erhitzt und über Gelelektrophorese (1% Agarose in Laufpuffer, 5 V/cm) aufgetrennt. Daraufhin wurde das Gel 3x 5min in H₂O, 1x 12min in (50mM NaOH, 1,5M NaCl) und 2x 15min in 10xSSC geschwenkt und die mRNA auf Hybond N Membranen (Amersham) transferiert („Vacuum Blotter“ (Appligene), Laufmittel 10x SSC). Anschließend wurde die Probe mit UV an die Membran gebunden (Stratalinker (Appligene), 70000 µJ/cm²). Zur Kontrolle der mRNA-Präparation wurde die Membran 45sec mit Methylenblau-Lösung gefärbt und dreimal 1min mit H₂O entfärbt.

Hybridisierung: ca. 400bp vom 5' Bereich der kodierenden Sequenz der zu untersuchenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert, über Gelelektrophorese in 2% Agarose getrennt und die PCR Produkte über „Qiaquick gel extraction kit“ Säulen (Qiagen) gereinigt. Mit Hilfe des „Hexanucleotide labelling kits“ (Roche) wurden daraus mit [α - 32 P] dATP markierte DNA Fragmente synthetisiert, die erneut über Qiaquick-Säulen gereinigt und zusammen mit Hybridisierungspuffer und „Herring sperm DNA“ (0,1mg/ml) erhitzt wurden (5min 95°C). Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten bei 42°C in Hybridisierungslösung über 4-24 h, anschließend wurden die Membranen gewaschen (2x kurz 2xSSC, 0,1% SDS; 2x 5min RT 0,2xSSC, 0,1% SDS; 2x 15min 42°C 0,2xSSC, 0,1% SDS; 1x 2xSSC) und gegen BAS-MS Folien exponiert. Die Blots wurden bis zu zweimal durch kurzes Aufkochen in 0,5% SDS gestrippt. Die „Phosphor Imager“ Folien wurden mit einem BAS 2000 Leser (Fuji) ausgelesen. Zur Quantifizierung diente das Programm TINA 2.08. Die Bestimmung der Expressionshöhe der untersuchten Transkripte erfolgte relativ zur Menge der *ACT1* mRNA (Aktin), die von den untersuchten Gendelektionen nicht systematisch beeinflusst wurde.

2.4.3 Messung der Expression von *INO1* und *OPI3* in Mutantenstämmen

S. cerevisiae Zellen verschiedener Stämme wurden über Nacht in SD (+ Lys, 10 μ M Inositol) vorkultiviert, in SD(-Ino) (+ Lys, 5 μ M Inositol) aufgenommen (OD₆₀₀ = 0,35) und weitere 4,5 h kultiviert. Daraufhin wurden 5 OD₆₀₀ Zellen geerntet und daraus mRNA präpariert.

Für die Untersuchung der Anschaltkinetik der Expression von Genen des Lipidstoffwechsels wurden YWO1 und YJU73 Zellen in gleicher Weise kultiviert, jedoch zu den Zeitpunkten 0, 1, 2 und 4,5 h nach Inokulation des Inositol-armen Mediums jeweils 5 OD₆₀₀ Zellen entnommen.

2.4.4 Einfluß von Inhibitoren des Lipidstoffwechsels

YWO1 Zellen (transformiert mit pJU450, pRS416 und pRS317) wurden über Nacht in SD(-Ino) (+ 0,005% NP40) angezogen, am folgenden Morgen in frischem Medium aufgenommen und weitere 2,5 h kultiviert (OD₆₀₀ ca. 0,4). Anschließend wurden 5 OD₆₀₀ Zellen für den Nullwert abgenommen. Der Rest der Kultur wurde geteilt und ohne oder mit Inhibitoren (200ng/ml Myriocin, 200ng/ml Australifungin, 20ng/ml AbA) weiter inkubiert. Nach 1, 2 und 4,5 h wurden jeweils 5 OD₆₀₀ Zellen entnommen und daraus mRNA präpariert.

2.5 Lipidanalytik

2.5.1 Allgemeine Techniken

Extraktionslösung	EtOH/ H ₂ O/ Et ₂ O/ Pyridin/ NH ₄ OH (25%) (15:15:5:1:0,018)
Methylaminlösung	CH ₃ NH ₂ (33% in EtOH)/ H ₂ O (3:1) (Clarke und Dawson, 1981)
Probenlösung	CHCl ₃ / MeOH/ H ₂ O (16:16:5)
Solvenz A	CHCl ₃ / MeOH/ NH ₄ OH (4,2N) (9:7:2)
Solvenz B	CHCl ₃ / MeOH/ KCl (0,25%) (11:9:2)

Für alle Arbeiten mit leichtflüchtigen Flüssigkeiten wurden gasdichte Glasspritzen (Hamilton; 10, 50, 100 bzw. 500µl) verwendet. Zum Entfernen von Lösungsmitteln zwischen einzelnen Schritten wurde unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) Stickstoff eingeblasen. Die Messung der Radioaktivität in verschiedenen Lösungen erfolgte in Rotiscint (Roth) mit einem Beckman LS 6000LL Szintillationsmeßgerät.

Zur Untersuchung der Lipidzusammensetzung wurden die Hefen mit verschiedenen radioaktiven Substanzen (³H-Serin, ³H-Inositol, ³³P) markiert. Anschließend wurden die Kulturen mit 5% Trichloressigsäure (TCA) behandelt (5min Eis), um Phospholipasen zu denaturieren, zentrifugiert (1min 14000rpm 4°C) und die Zellen zweimal mit Wasser (+ 50µg/ml Digitonin zum besseren Pelletieren) gewaschen. Daraufhin wurden mit einer Extraktionslösung Lipide extrahiert (1-2x 0,5ml, 20min 60°C, Zentrifugation: 2min 5000rpm im vorgewärmten Rotor) und unter N₂ getrocknet.

Die Deacylierung von Acylestern erfolgte, indem die Lipide in 0,5ml Methylaminlösung aufgenommen, 90min auf 53°C erhitzt und unter N₂ getrocknet wurden. Anschließend wurden hydrophile Spaltprodukte durch eine Butanolextraktion entfernt. Dazu wurden 200µl H₂O und 250µl wassergesättigtes Butanol zu den Lipiden gegeben, die Tubes 2min geschüttelt (2200rpm) und zentrifugiert (2min 16000xg). Die Butanolphase wurde abgenommen und die wäßrige Phase ein weiteres Mal mit 200µl Butanol (H₂O) extrahiert. Die Butanolphasen wurden vereinigt und unter N₂ getrocknet.

Für die Analyse der Lipidzusammensetzung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden die Lipide in 25-200µl Probenlösung aufgenommen, Proben von 10-25 µl auf 20x20cm Kieselgel 60 Platten (Merck; 200µm Schichtdicke auf Glas) appliziert und in Solvenz A oder B aufgetrennt. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel wurden die Platten gegen BAS-MS (³³P) oder BAS-TR Folien (³H) exponiert und diese mit einem „Phosphor Imager“ (BAS 2000) ausgelesen. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm Tina 2.08.

2.5.2 Bestimmung des Gehalts an Sphingolipiden

Zur Bestimmung des Anteils der Sphingolipide an den gesamten Phospholipiden wurden die Zellen mit ^{33}P -Phosphat markiert. Dazu wurde ein Phosphat-reduziertes und Inositol-freies YNB (-Ino, 5% P) aus den einzelnen Inhaltsstoffen gemischt (5% K-Phosphat relativ zu YNB, die restlichen 95% des Kaliums als KCl). Die zu untersuchenden Hefen wurden über Nacht in 4ml SD(-Ino, 5% P) (+Lys +20 μCi ^{33}P) mit verschiedenen Konzentrationen Inositol bis zum Erreichen einer Dichte von 0,5 OD₆₀₀ kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 5% TCA behandelt, Lipide extrahiert, das Extrakt auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und unter N₂ getrocknet. Eine Hälfte der Proben wurde mit Methylamin deacyliert und erneut unter N₂ getrocknet. Anschließend wurden alle Proben mit Butanol extrahiert und die Butanolphase unter N₂ getrocknet. Die Lipide wurden in 200 μl Probenlösung aufgenommen und 20 μl über DC in Solvenz A aufgetrennt.

Für die Untersuchung des Einflusses von Aureobasidin A (AbA) auf den Sphingolipid Gehalt wurden Hefen der Stämme YWO1 und YJU73 über Nacht in 4ml SD(-Ino, 5% P) (+ Lys, 75 μM Inositol, 0,002% NP40, 20 μCi ^{33}P) angezogen, in dem gleichen Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und mit oder ohne 9ng/ml AbA weitere 6 Stunden kultiviert. Die weitere Bestimmung des Sphingolipid Gehaltes erfolgte wie oben beschrieben.

2.5.3 Analyse der Stabilität von Sphingolipiden

Zellen der Stämme YWO1 und YJU73 wurden über Nacht in 10ml SD(-Ino, 5% P) (+ Lys, 75 μM Inositol, 0,005% NP40, 30 μCi ^{33}P) bis zum Erreichen einer Dichte von 0,34 OD₆₀₀ kultiviert. Dann wurden die Zellen pelletiert, einmal mit SD (+ Lys, 75 μM Inositol, 0,005% NP40) gewaschen und in 6,3 ml des letzteren Mediums aufgenommen. Zur vollständigen Inhibition der IPC Synthese wurde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AbA zugegeben und die Kulturen weiter bei 30°C inkubiert. Nach 0, 2 und 4 Stunden wurden Proben von jeweils 1ml entnommen und mit 5% TCA auf Eis inkubiert (15min). Daraufhin wurden die Zellen pelletiert, zweimal mit H₂O (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin) gewaschen und bei -80°C gelagert. Aus dem Zellpellet wurden mit 0,5ml Extraktionslösung Lipide solubilisiert (30min 60°C), die anschließend deacyliert und Butanol-extrahiert wurden. Die Proben wurden in 50 μl Probenlösung aufgenommen und davon 10 μl mit Solvenz A aufgetrennt.

2.5.4 Identifizierung der verschiedenen Lipide

YWO1 und YJU73 Hefen wurden in SD(-Ino) (+ Lys, 15 bzw. 75 μM Inositol) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen, im gleichen Medium in einer Dichte von 0,4 OD₆₀₀ (2,5 ml) auf-

genommen und 6 h mit 25µCi ^3H -Serin bzw. ^3H -Inositol markiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5% TCA behandelt und Lipide extrahiert. Eine Hälfte der Probe wurde deacyliert und mit Butanol extrahiert. Die Auftrennung der Lipide in der Dünnschichtchromatographie erfolgte mit Solvenz A.

Zur Identifizierung von mit ^3H -Serin markierten Banden als Ceramid wurden Hefen der Stämme YWO1, YJU143, YJU145, YJU223, YJU73, YJU147, YJU150 und YJU224 verwendet. Die Hefen wurden in SD (+ Lys, 75µM Inositol) bei 30°C angezogen, 0,5 OD₆₀₀ Zellen in 1ml frischem Medium aufgenommen und für 15min bei 38°C vorinkubiert, um eine Erhöhung der Ceramidsynthese zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen für 40min bei 38°C mit 12,5µCi ^3H -Serin markiert, mit 5% TCA behandelt und Lipide extrahiert (1x 500µl 30min). Diese wurden deacyliert, mit Butanol extrahiert und in 25µl Probenlösung aufgenommen. Die gesamten Proben wurden auf DC-Platten appliziert und mit Solvenz B getrennt.

2.5.5 Bestimmung des Ceramidgehaltes

YWO1, YJU73 und YJU191 Zellen wurden über Nacht in SC(-Ino) (+ 1mM Cholin, 0,3M Sorbitol, 0 bzw. 75µM Inositol) angezogen. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen (1OD₆₀₀ in 1ml; in Inositol-freiem Medium kultivierte YJU73 Zellen: 2OD₆₀₀ in 1ml), mit 1ml (0,3M Sorbitol, 1mM Cholin, 50µg/ml Serin) gemischt und eine weitere Stunde kultiviert. Dann wurden die Hefen mit 20µCi ^3H -Serin über 3 h markiert. (In Vorversuchen wurde die verbleibende Aktivität im Medium gemessen und die Bedingungen so gewählt, daß etwa die Hälfte des ^3H -Serin von den Zellen aufgenommen wurde und so eine gleichmäßige Markierung über die Zeit erreicht wurde.) Anschließend wurden die Zellen mit 5% TCA behandelt, gewaschen und Lipide extrahiert (1x 30min 500µl). Nach Deacylierung und Butanolextraktion wurden die Lipide in 25µl Probenlösung aufgenommen und die gesamte Probe chromatographisch in Solvenz B aufgetrennt.

2.5.6 Analyse des Lipidtransports in *sec18-1* Stämmen

Zellen der Stämme YTX48 und YJU229 wurden in SD-Leu bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Anschließend wurden die Hefen in SD(-Ino)-Leu aufgenommen (1 OD₆₀₀/ml) und 4 x 1ml auf 2ml Eppendorf-Gefäße verteilt. Die Kulturen wurden für 20min bei 25 bzw 38°C vorinkubiert. Dann wurden 20µCi ^3H -Inositol bzw 30µCi ^3H -Serin zugegeben und die Kulturen weitere 40min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Die Markierung wurde durch Zugabe von 5% TCA gestoppt (5min Eis) und Lipide extrahiert, zur Hälfte deacyliert, mit Butanol extrahiert und über DC getrennt (Solvenz A).

2.5.7 Analyse der Zusammensetzung von GPI-Ankern

Die Methode zur Präparation von GPI-Ankern wurde frei nach publizierten Methoden entwickelt (Sipos et al., 1997).

Hefen der Stämme YWO1 und YJU73 wurden in SD + Lys bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Jeweils 2,5 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet, in 5ml SD(-Ino) + Lys aufgenommen und 3,5 h mit 30µCi ³H-Inositol markiert. Anschließend wurden 100µM Inositol und 100µg/ml Cycloheximid zugegeben und die Zellen für weitere 15min inkubiert um ein vollständiges „Remodelling“ der GPI-geankerten Proteine zu ermöglichen. Die Hefen wurden geerntet (1min 2500rpm), zweimal mit H₂O (+ 50µg/ml Digitonin) gewaschen und bei -80°C gelagert.

Für die Präparation von Ankerpeptiden wurden die Zellen in 200µl Aufschlußpuffer (50mM Hepes (pH7,5), 5mM EDTA) 2x 2min mit Glaskugeln zermahlen, mit weiteren 2x 400µl Aufschlußpuffer von den Glaskugeln abgenommen und durch ein 300µl Glycerolkissen (20mM Hepes (pH 7,5), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 20% Glycerol) zentrifugiert (20min, 60000rpm, 4°C, TLA100.3). Im nächsten Schritt wurden die in dem Pellet enthaltenen Lipide (>99% der ³H-Aktivität) durch fünf Extraktionsschritte möglichst vollständig entfernt. Dazu wurde das Pellet jeweils in 200µl H₂O (+1mM EDTA) mit Ultraschall resuspendiert, mit 1,4 Vol EtOH/Et₂O/ Pyridin/ NH₄OH (25%) (15:5:1:0,018) gemischt, 10min bei 60°C geschüttelt, zentrifugiert (1min, 5000rpm, 60°C) und der Lipidextrakt abgenommen. Nach der dritten Extraktion wurde das in H₂O resuspendierte Proteinpellet in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Kontrolle wurde die Radioaktivität in den Lipidextrakten und dem Pellet gemessen. Eine Probe des Proteinpellets wurde dazu zuvor 5min in 1%SDS, 0,2N NaOH gekocht, um eine aussagekräftige Messung der Radioaktivität zu erhalten. Die Delipidierung entfernte ca. 99,3% des inkorporierten ³H-Inositols.

Zur weiteren Behandlung wurde das Proteinpellet in 200µl (50mM Hepes (pH 7,4), 1mM EDTA, 1% Zwittergent 3-16) resuspendiert, 15min gekocht und 90min bei 37°C mit 250 µg/ml Proteinase K behandelt. Anschließend wurde der Ansatz erhitzt (3min 85°C), zentrifugiert (2min 16000xg) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde einmal mit 100µl Filtrationspuffer (FP: 5mM Hepes pH 7,5, 0,01% Zwittergent 3-16) gewaschen und die Überstände vereinigt. Zum Abtrennen der Peptide wurden die Proben über eine Gelfiltrationssäule (PD10, Roche, äquilibriert in FP) aufgetrennt. Die radioaktiven Startfraktionen wurden vereinigt (1,08ml) und über einen Microcon 10 Filter (Gelman) eingeengt. Das Konzentrat (60-70µl) wurde abgenommen und der Filter 2x mit FP nachgewaschen (vereinigtes Volumen: 200µl).

Um verbleibende Spuren von Phospholipiden zu entfernen, wurden die Proben zweimal mit wassergesättigtem Butanol (1x 250µl, 1x 200µl) extrahiert und die vereinigte Butanolphase dreimal mit butanolgesättigtem Wasser (je 200µl) gegenextrahiert. Der überwiegende Teil der Radioaktivität befand sich in der vereinigten wäßrigen Phase (0,8ml) und somit in Anker-

peptiden. Die wäßrige Phase wurde in drei Aliquots (A-C) geteilt und über Nacht getrocknet (Speedvac, Appligene, 50°C). Probe B wurde anschließend mit 0,5ml Methylaminlösung deacyliert und unter N₂ getrocknet.

Im nächsten Schritt wurden die Proben mit frisch präparierter salpetriger Säure (A, B) oder Kontrollösung (C) behandelt (50mM NaAcetat (pH 4,0), 250mM NaNO₂ bzw. NaCl; 1x 100µl 1h 50°C; 2x erneute Zugabe von 50µl frischem Reagenz, jeweils 30min 50°C) (Shively und Conrad, 1976; Sipos et al., 1997). Anschließend wurden die Proben erneut zweimal mit Butanol extrahiert (1x 250, 1x 200µl Butanol (H₂O)) und die Butanolphase einmal mit 200µl H₂O (Butanol) gegenextrahiert. Ein großer Teil der Aktivität in den Proben A und B befand sich nun in der vereinigten Butanolphase, während sie in Probe C in der wäßrigen Phase verblieb.

Die Butanolphase wurde unter N₂ getrocknet, die Lipide in 25µl Probenlösung aufgenommen und über DC in Solvenz B aufgetrennt. Die Identifizierung der publizierten Spaltprodukte erfolgte durch den Vergleich des Laufverhaltens mit dem von mit ³H-Inositol markierten Lipiden (mit und ohne Deacylierung) aus den Stämmen YWO1 und YJU145 (*scs7*).

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung eines Kopplungsproduktes von Cue1p

3.1.1 Vorversuche

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue Komponenten der ER-assoziierten Proteindegradation zu identifizieren. Daher wurde getestet, ob sich an diesem Abbausystem beteiligte Proteine (Cue1p, Ubc6p, Ubc7p, Hrd1p, Hrd3p) mit verschiedenen quervernetzenden Reagenzien an unbekannte Proteine koppeln lassen. Es zeigte sich, daß Cue1p unter nativen Expressionsbedingungen mit für SH-Gruppen spezifischen homobifunktionellen „Crosslinkern“ (z.B. Bismaleimidohexan BMH) bei hoher Ausbeute zwei Kopplungsprodukte bildete, die nach ihrem Laufverhalten im SDS-PAGE eine Größe von ca. 49 und 70 kDa hatten. Cue1p ist ein 23 kDa großes, vorwiegend cytosolisches Protein, das über eine hydrophobe Sequenz am unmittelbaren N-Terminus in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert ist (Biederer et al., 1997). Für die Charakterisierung und Reinigung der Quervernetzungsprodukte wurde ein Expressionsvektor konstruiert (pJU310), der für ein chimäres Protein Cue1(glyk)p kodiert, in dem der N-Terminus von Cue1p um 16 Aminosäuren verlängert ist, wobei die Positionen 3-5 als Sequenz für eine N-Glykosylierung dienen. Um eine effiziente Insertion dieses Proteins in die Membran zu gewährleisten, enthielt dieses Konstrukt zudem am N-Terminus eine Signalsequenz. Eine Immunoblot Analyse (Anti-Cue1) des in einem *cue1* Stamm exprimierten Fusionsproteins zeigte, daß dieses in die Membran integriert war und ca. 70% des gebildeten Proteins eine Glykosylierung trug. Die Behandlung mit BMH ergab für Cue1(glyk)p ein Muster von Kopplungsprodukten analog zu dem von Cue1p, wobei sich aufgrund der unvollständigen Glykosylierung das ursprüngliche 49 kDa Produkt als Cue1p-Dimer identifizieren ließ (3 Banden im SDS-PAGE), während die 70 kDa Bande ein Quervernetzungsprodukt zu einem unbekannten Protein darstellte (2 Banden). Dieses zu identifizieren und zu charakterisieren wurde als aussichtsreiches Projekt bewertet, was zu der hier vorliegenden Arbeit führte.

3.1.2 Identifizierung von Scs2p als Quervernetzungspartner von Cue1p

Für die Reinigung des Cue1p-Kopplungsproduktes wurden *cue1* Zellen verwendet, die Cue1(glyk)p von zwei Einzelkopie-Vektoren exprimierten. Die einzelnen Schritte waren: Aufschluß der Zellen, Membranpräparation, Quervernetzung, Waschen der Membranen mit Saponin, Solubilisierung der Membranproteine, Reinigung von Glykoproteinen über ConA -

Sepharose, Anti-Cue1 Affinitätschromatographie und SDS-PAGE. Eine anschließende Färbung mit Coomassie zeigte, daß durch diese Prozedur drei Proteine aufgereinigt wurden, deren Molekulargewicht dem von Cue1(glyk)p sowie seinen beiden Kopplungsprodukten entsprach (Abb. 3A).

Das in der oberen Bande enthaltene Protein wurde mittels tryptischen Verdaus in Peptide gespalten, diese über HPLC getrennt und die Sequenz einzelner Peptide durch Edman-Abbau bestimmt (AG Proteinchemie am MDC). Ein Vergleich der Sequenzen mit dem gesamten Hefegenom (SGD) zeigte, daß drei der Peptide von Cue1(glyk)p stammten und drei weitere mit Sequenzabschnitten des offenen Leserahmens YER120w übereinstimmten. Das entsprechende Gen war zuvor unter dem Namen SCS2 beschrieben und anfänglich charakterisiert worden (siehe Einleitung).

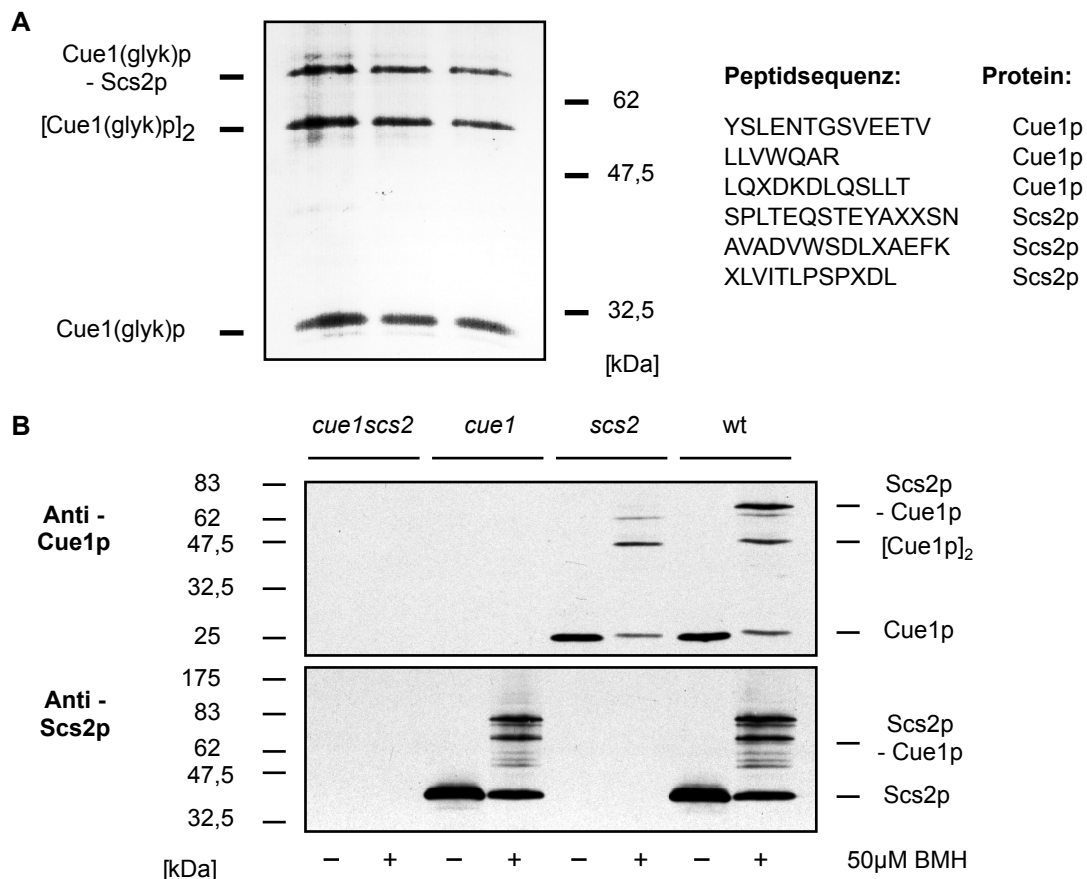


Abb. 3 A Aufreinigung von Kopplungsprodukten einer glykosylierten Variante von Cue1p (mit Coomassie gefärbtes Gel). Aus der oberen Bande wurden Peptide gewonnen und ansequenziert, wodurch Scs2p als Quervernetzungspartner von Cue1p identifiziert wurde. **B** Sowohl Cue1p als auch Scs2p ergeben bei Behandlung mit BMH ein ca. 70 kDa großes Kopplungsprodukt, welches in *scs2* bzw. *cue1* Stämmen abwesend ist.

Für die weiteren Untersuchungen wurde SCS2 in verschiedenen Wildtyp- und Mutantenstämmen deletiert. Ein Vergleich der Quervernetzungs-Muster von Cue1p in Membranen aus Wildtyp und *scs2* Zellen zeigte, daß die Deletion von SCS2 keinen Einfluß auf die Proteinmenge von Cue1p hatte, das 70 kDa große Kopplungsprodukt jedoch in *scs2* Zellen nicht mehr gebildet wurde (Abb. 3B).

Des weiteren wurde ein Plasmid konstruiert (pJU326), von dem ein mit einer N-terminalen HIS₆-Sequenz versehenes und um den C-terminalem Membrananker verkürztes Protein HIS₆-Scs2(Δ T)p in *E. coli* exprimiert wurde. Das rekombinante Protein wurde über Ni-NTA Agarose gereinigt und diente zur Immunisierung von Kaninchen sowie zur Affinitätsreinigung der Anti-Scs2 Antikörper. Eine Immunoblot Analyse von Gesamtextrakt bzw. Membranen aus wt und *scs2* Zellen ergab, daß der gereinigte Antikörper spezifisch ein 35 kDa großes Membranprotein erkannte, welches in *scs2* Zellen abwesend war. Das abweichende Laufverhalten im SDS-PAGE gegenüber dem rechnerischen Molekulargewicht (27 kDa) entspricht den publizierten Daten (Kagiwada et al., 1998).

Die nachfolgende Quervernetzungs Analyse in wt und *cue1* Hefen zeigte, daß sich auch bei einer Detektion mit Anti-Scs2 Antikörpern ein Kopplungsprodukt von 70 kDa nachweisen ließ, welches in *cue1* Hefen nicht gebildet wurde. Dieses war jedoch nur eines von mehreren Quervernetzungsprodukten, obwohl nur ein Teil des Scs2p an andere Proteine koppelte und ca. 30% des Cue1p an Scs2p gebunden wurden (Abb. 3B). Demzufolge ist Scs2p ein wesentlich häufigeres Protein als Cue1p. Darauf deutet auch der Index der Nutzung von bevorzugt verwendeten Kodons in SCS2 hin (codon bias: 0,269), der Scs2p als relativ hoch exprimiertes Protein ausweist (Coghlan und Wolfe, 2000). Versuche einer Kopräzipitation von Scs2p mit Cue1p nach Solubilisierung mit Digitonin oder Triton X100 blieben erfolglos.

3.2 Auswirkungen einer Deletion von SCS2 auf die Cue1p-abhängige Proteindegradation am ER

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob das Fehlen von Scs2p einen Einfluß auf die verschiedenen Cue1p/Ubc7p-abhängigen Degradationswege am Endoplasmatischen Retikulum hat. Als Beispiel für den Abbau von integralen Membranproteinen wurde in einem „pulse-chase“ Experiment die Degradation von Sec61-2p beobachtet, einer mutierten Komponente des im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Translokationsapparates, die bei erhöhter Temperatur (38°C) degradiert wird (Biederer et al., 1996; Biederer et al., 1997). Während *cue1* Zellen wie publiziert eine deutliche Stabilisierung zeigten, erfolgte der Abbau in *scs2* Mutanten mit Wildtypkinetik (Abb. 4B). Ein Vergleich des Wachstums der *sec61-2* Stämme auf Minimalmedium bei 36,5°C zeigte, daß eine Deletion von *CUE1*, nicht aber von SCS2, die Temperatursensitivität der Hefen supprimierte (Abb. 4A).

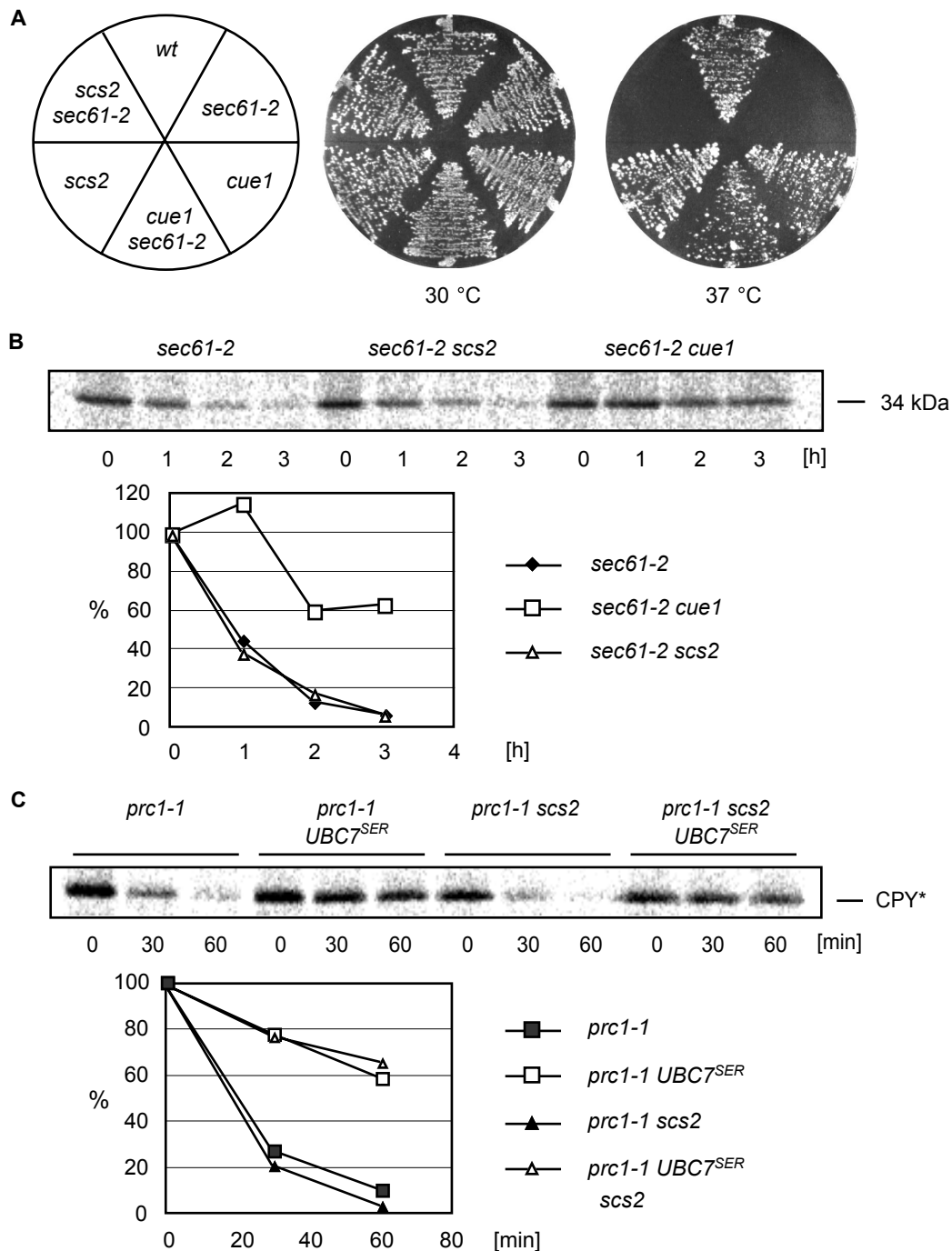


Abb. 4 **A** Die Deletion von *SCS2* komplementiert nicht die Temperatursensitivität von *sec61-2* Zellen. **B** *Sec61-2p* ist in *scs2* Zellen im Gegensatz zu *cue1* Mutanten nicht stabilisiert. **C** Die Deletion von *SCS2* hat keinen Einfluß auf die Abbaurate von CPY* in wt und *UBC7^{SER}* Stämmen (Bezeichnung des mutierten Allels von CPY: *prc1-1*).

Als zweites wurde die Degradation von CPY* untersucht, eines falsch gefalteten löslichen Proteins, das im Lumen des ER zurückgehalten und abgebaut wird (Biederer et al., 1997; Finger et al., 1993). Auch bei diesen Versuchen zeigte sich kein Einfluß der *scs2* Deletion auf die Abbaukinetik in wt oder *cue1* Zellen. Die Deletion von *SCS2* in Stämmen, die statt des nativen Ubc7p ein katalytisch inaktives Ubc7^{SER}p exprimierten, führte zu dem

gleichen Resultat (Abb. 4C). Wurde Scs2p von einem „multi-copy“ Vektor (pJU344) über-exprimiert, beeinflusste das den Abbau von CPY* allenfalls minimal (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Experimenten wurde im Immunoblot die Proteinmenge eines cytosolischen (Deg1-GFP) (Lenk und Sommer, 2000) und eines C-terminal in die ER Membran inserierten Degradationssubstrates (Ubc6p) (Walter et al., 2001) in wt, *cue1* und *scs2* Zellen bestimmt. Der Abbau beider Proteine erfolgt unabhängig von Hrd1p und Hrd3p und damit über einen anderen Weg als die Degradation der oben genannten Substrate. Auch hier zeigte sich eine Stabilisierung in *cue1*, nicht aber in *scs2* Stämmen.

Obwohl es denkbar ist, daß es weitere Varianten der Cue1p-abhängigen Degradation gibt und Scs2p im Zusammenhang mit diesen als Komponente der ER-Degradation fungiert, erscheint es naheliegender anzunehmen, daß die ER-assoziierte Proteindegradation ein Effektor der Funktion von Scs2p ist.

3.3 Die „Unfolded Protein Response“ ist in *scs2* Zellen nicht beeinträchtigt

Bei einer ersten Charakterisierung von Scs2p zeigten (Kagiwada et al., 1998), daß *scs2* Mutanten sensitiv gegen Tunicamycin (Tm) sind. Dieser Phänotyp ist u.a. bei Stämmen mit Mutationen in der „unfolded protein response“ (UPR) zu beobachten. Da Scs2p somit möglicherweise eine Verbindung zwischen ER-Degradation und UPR herstellen könnte, wurden Stämme mit Deletionen von *SCS2* und/oder Komponenten der UPR (*HAC1*, *IRE1*) konstruiert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Tm getestet.

scs2 Mutanten zeigten gegenüber dem Wildtyp, ebenso wie *ire1* oder *hac1* Zellen, ein eingeschränktes Wachstum auf Tm-haltigem Nährmedium. Doppelmutanten von *scs2* mit einem der anderen Gene wiesen eine erhöhte Sensitivität auf (Abb. 5A). Wurden diese Stämme hingegen auf das Überleben einer kurzzeitigen Behandlung mit hohen Konzentrationen von Tm (10µg/ml) getestet, zeigte sich, daß sowohl wt als auch *scs2* Zellen diese Behandlung ohne Verlust ihrer Lebensfähigkeit überstanden, während nur ungefähr 0,2 % der *ire1* oder *ire1 scs2* Zellen anschließend Kolonien bildeten (Abb. 5B).

Um auch die Proteinmenge von (Hac1-i)p zu untersuchen, welches bei einer Induktion der UPR nach einer korrekten Prozessierung der *HAC1* mRNA gebildet wird, wurde im Immunoblot ein mit einem Epitop markiertes Hac1p (6xHA-Hac1p) analysiert. Ein Test auf Funktionalität zeigte, daß die Expression des mit einem Epitop versehenen Proteins von einem „single-copy“ Vektor (pJU356) die Tm-Sensitivität von *hac1* Mutanten ebenso supprimierte wie die Expression von nicht markiertem Hac1p (pJU350).

Die „Western blot“ Analyse mit Anti-HA Antikörpern ergab, daß *hac1 scs2* Zellen das 6xHA-(Hac1-i)p Protein nach Induktion der UPR mit Tunicamycin (1h, 1µg/ml) ebenso synthetisieren wie *hac1* Hefen (Abb. 5C).

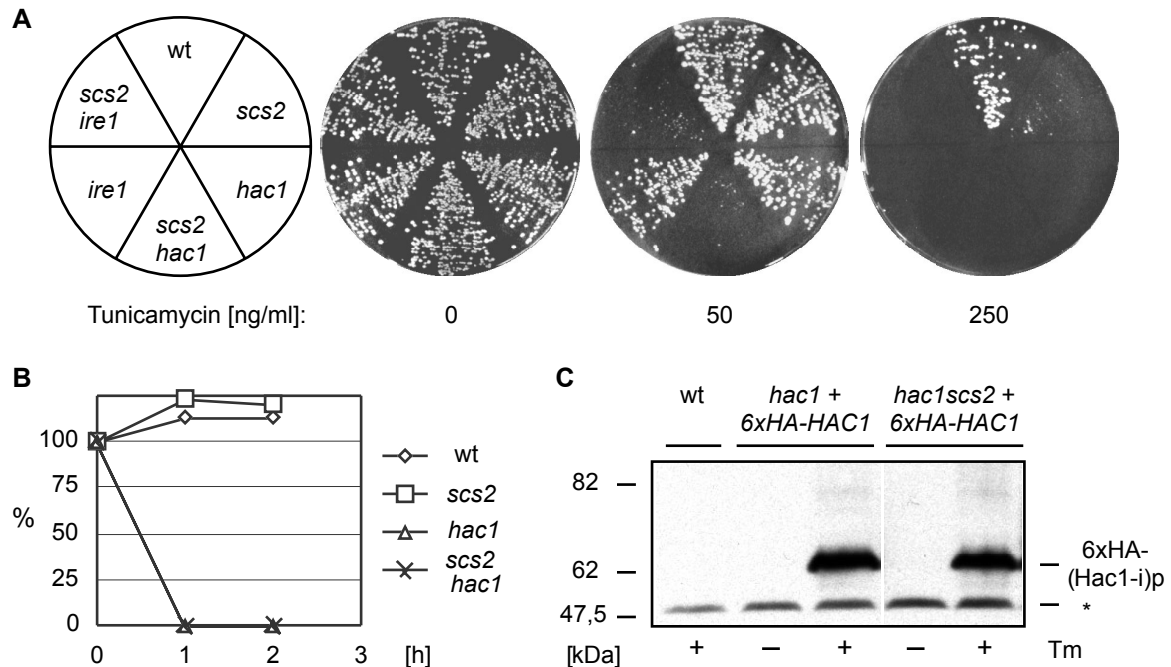


Abb. 5 A Die Deletion von SCS2 in wt, *hac1* und *ire1* Zellen führt zu einer erhöhten Sensitivität dieser Stämme gegenüber Wachstum auf Tunicamycin-haltigem Medium. B Überlebensrate von Zellen nach einer kurzen Behandlung mit hohen Konzentrationen an Tm (10µg/ml). *scs2* Zellen sind, im Gegensatz zu Mutanten mit einer defekten „unfolded protein response“, nicht sensitiv gegenüber einer akuten Behandlung mit Tm. C Nachweis einer Epitop-markierten Form von Hac1p im Immunoblot (* Nebenbande des Anti-HA Antikörpers). Die Bildung von 6xHA-(Hac1-i)p nach Induktion mit Tm ist in *scs2* Mutanten nicht verändert.

Daher beruht das verringerte Wachstum von *scs2* Zellen auf Tunicamycin-haltigen Kulturmedien nicht auf einer beeinträchtigten Induktion der „unfolded protein response“ unter Streßbedingungen.

3.4 Notwendigkeit der Membranlokalisierung von Scs2p für dessen Funktionalität

Scs2p ist ein Membranprotein, das über eine C-terminale hydrophobe Aminosäuresequenz in der ER Membran verankert ist, wobei sich der überwiegende Teil des Proteins im Cytosol befindet. Um den Einfluß dieser Transmembrandomäne zu untersuchen, wurde ein Plasmid (pJU332) für die Expression eines um diese Aminosäurefolge verkürzten Scs2(Δ T)p in Hefe konstruiert. Im Gegensatz zu einem das vollständige Gen enthaltenden Vektor

(pJU330) komplementierte dieses Plasmid die erhöhte Sensitivität eines *scs2* Stammes gegenüber dem Wachstum auf Tm-haltigen Medien nicht.

Im Immunoblot zeigte sich, daß das verkürzte Protein normal exprimiert wurde und sich bei einer einfachen Zellfraktionierung im Cytosol befand, unabhängig davon, ob natives Scs2p ebenfalls exprimiert wurde (Abb. 6A). Zudem wies dieses Protein im SDS-PAGE ein noch größeres Molekulargewicht als Scs2p auf. Um festzustellen, ob das abweichende Laufverhalten von Scs2(Δ T)p durch eine kovalente Modifikation verursacht wird, wurde ein nahezu identisches Protein Scs2p(S2P; Δ T)p in *E. coli* exprimiert (pJU368). Dieses verhielt sich im SDS-PAGE wie in Hefe exprimiertes Scs2(Δ T)p (Abb. 6B).

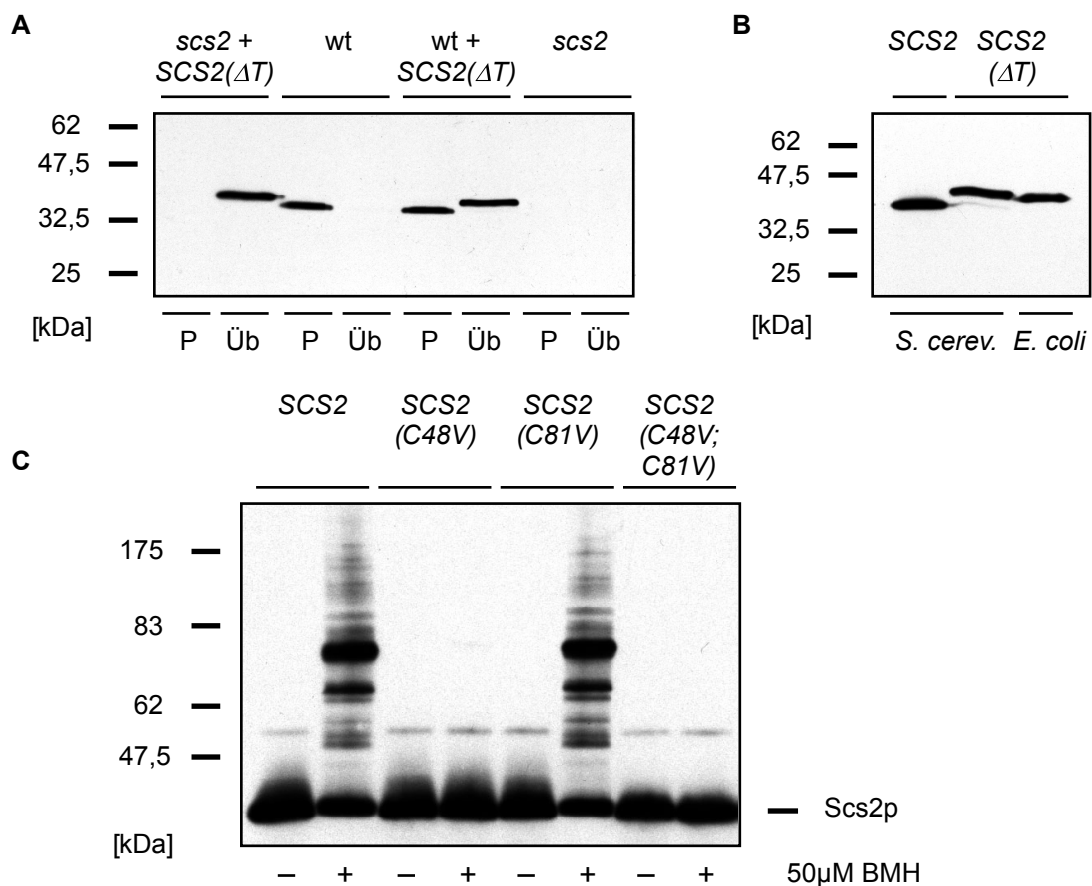


Abb. 6 Immunoblot Analysen mit Anti-Scs2 Antikörpern. **A** Verteilung von Scs2p und Scs2(Δ T) zwischen Pellet (P) und Überstand (Üb). **B** Vergleich des Laufverhaltens von Scs2p und Scs2(Δ T)p im SDS-PAGE mit dem von rekombinant hergestelltem Scs2(Δ T)p. **C** Analyse der Quervernetzungsprodukte (BMH) von nativem Scs2p und mutierten Varianten, in denen die beiden Cysteine durch Valin ersetzt wurden.

Scs2p enthält zwei Cysteine, von denen sich eines (Cys48) in einem konservierten Bereich von 16 Aminosäuren befindet. Da die Übertragung von Ubiquitin auf Abbausubstrate über die Bildung eines Thioesters erfolgt, wurde getestet, ob diese Cysteine für die Funktion des Proteins notwendig sind. Die Expression einer Punktmutante Scs2(C48V)p von einem

„single-copy“ Vektor (pJU343) komplementierte genau wie die des nativen Proteins (pJU342) die Tunicamycin-Sensitivität von *scs2* Zellen. Auch bei späteren Tests auf Komplementation der Inositol-Abhängigkeit sowie der Sensitivität gegen Aureobasidin A erwies sich Scs2(C48V)p als uneingeschränkt funktional. Im SDS-PAGE zeigte sich kein Unterschied des mutierten zum nativen Protein. Dieses Protein ergab jedoch mit dem quervernetzenden Reagenz BMH nahezu keine Kopplungsprodukte mehr. Eine Mutation des zweiten Cysteins zu Valin (C81V) blieb ohne jeglichen Effekt (Abb. 6C; Stämme: *scs2* + pJU 330, 331, 362 bzw. 363). Demnach ist Cys48 zwar nicht für die Funktionalität von Scs2p notwendig, aber an der Proteinoberfläche exponiert, so daß die konservierte Aminosäurefolge um Cys 48 an der Interaktion mit anderen Proteinen oder Liganden beteiligt sein könnte.

3.5 Der Proteintransport durch den sekretorischen Weg ist in *scs2* Stämmen nicht beeinträchtigt

Untersuchungen zur Funktion von tierischen Proteinen mit Sequenzhomologie zu Scs2p führten zu der Hypothese, daß diese Proteine eine Funktion im Rahmen des Proteintransportes durch den sekretorischen Weg erfüllen könnten (Nishimura et al., 1999; Skehel et al., 1995; Soussan et al., 1999). Daher wurde untersucht, ob in *scs2* Hefen der Transport zweier Testsubstrate aus dem ER beeinträchtigt ist. Eines davon war CPY, eine vakuoläre Protease, die während des Transports durch Signalsequenz-Prozessierung, N-Glykosylierung im ER, Verlängerung der Zuckerketten im Golgi Apparat und proteolytische Abspaltung der Prosequenz in der Vakuole modifiziert wird (Van Den Hazel et al., 1996). Das zweite war Gas1p, ein GPI-geankertes Protein der Zellwand, das ebenfalls charakteristische Veränderungen der Glykosylierung während des Transports durch den sekretorischen Weg erfährt. Der Export von GPI-geankerten Proteinen aus dem ER erfolgt erst nach der Transacylierung auf den Lipidanker und über einen separaten, COPII-abhängigen, Transport-Mechanismus, der durch Inhibitoren des Sphingolipid-Stoffwechsels gehemmt wird (Riezman et al., 1994; Sutterlin et al., 1997). Die Untersuchung des Transports in einem „pulse-chase“ Experiment erfolgte in Inositol-haltigem SD (+ Lys) (enthält 11µM Inositol) statt in Inositol-freiem Medium, um eine Beeinträchtigung des Proteintransportes infolge der verminderten PI Synthese von *scs2* Stämmen auszuschließen.

Die Experimente ergaben, daß die untersuchten Proteine in *scs2* Mutanten normal modifiziert und durch den sekretorischen Weg transportiert wurden. Daher weisen *scs2* Deletionsmutanten, wie schon von (Kagiwada et al., 1998) in Hinblick auf die Sekretion von Suc2p gezeigt, keinen Defekt im Transport von Proteinen durch den sekretorischen Weg auf (Daten nicht gezeigt).

3.6 Die Einflüsse von *Scs2p*, UPR und ER-Degradation auf die Regulation des Glycerolipidstoffwechsels

3.6.1 Mutationen in *SCS2*, UPR und *CUE1/UBC7* bewirken additiv eine Inositol-Auxotrophie

Das *SCS2* Gen wurde ursprünglich als ein „multi-copy“ Suppressor der Inositol-Auxotrophie zweier Stämme beschrieben, von denen sich einer als eine *hac1* Mutante herausstellte (Nikawa et al., 1997). Dabei wurde auch gezeigt, daß eine Deletion von *SCS2* zu einer verringerten Derepression der *INO1* Expression in Inositol-freiem Medium führt.

Um diesen Phänotyp näher zu charakterisieren, wurde das Wachstum von Stämmen mit Deletionen in *SCS2* und/oder Genen der UPR (*HAC1*, *IRE1*) auf Platten mit Inositol-freiem Minimalmedium getestet. *scs2* Hefen wuchsen auf diesem Medium deutlich schlechter als wt Hefen, wobei wt und *scs2* Zellen schon bei Zugabe einer geringen Menge an Inositol (> 1µM) gleich große Kolonien bildeten. Das Wachstum von *hac1* oder *ire1* Stämmen in Inositol-freiem Medium war in unserem genetischen Hintergrund (DF5) ebenfalls nur beeinträchtigt, während diese Mutationen in anderen Wildtypstämmen zu Inositol-Auxotrophie führen (Cox et al., 1997). *scs2 hac1* oder *scs2 ire1* Doppelmutanten waren vollständig Inositol-auxotroph, so daß sich die Einflüsse einer *scs2* Deletion und einer defekten UPR gegenseitig verstärkten.

Während das Wachstum von *ubc7* oder *cue1* Zellen nicht von der Zugabe von Inositol beeinflusst wurde, wuchsen *hac1 ubc7* bzw. *ire1 cue1* Stämme in Inositol-freiem Medium deutlich schlechter als *hac1* oder *ire1* Einzelmутanten. Die Teilungsrate eines *scs2 ubc7* Stammes war gegenüber der von *scs2* Zellen leicht reduziert (Abb. 7A).

Bei Zugabe von mehr als 10µM Inositol wuchsen alle Stämme wie wt Zellen. Durch Wachstumstests auf Platten mit steigender Inositol Konzentration (0-10µM) ließ sich analysieren, welche Menge an Inositol dem Kulturmedium mindestens zugesetzt werden muß, um eine normale Teilungsrate zu ermöglichen. Dabei zeigte sich, daß *scs2 hac1 ubc7* Tripelmutanten unter allen Kombinationen von Deletionen den stärksten Phänotyp aufwiesen, so daß die Auswirkungen aller drei Gendeletionen auf die Inositol-Abhängigkeit additiv waren.

3.6.2 Die Deletion der Gene *SCS2*, *HAC1* oder *UBC7* verringert die Expression von *INO1* und *OPI3*

Saccharomyces cerevisiae reguliert die Expression von Genen des Phospholipid Stoffwechsels in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von dem Medium zugesetzten

Vorstufen der Lipidsynthese (Inositol, Cholin) in koordinierter Weise über die Transkriptionsfaktoren Ino2p/Ino4p (Greenberg und Lopes, 1996). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Inositol-Abhängigkeit die Folge einer verringerten Genexpression ist, wurde die Menge der *INO1* und *OPI3* mRNA in den verschiedenen Mutanten nach Wachstum in Medium mit niedrigem Inositolgehalt (5µM) analysiert. Die experimentellen Bedingungen wurden dabei so gewählt, daß die Zellen in dem Inositol-armen Medium die Ino2p/Ino4p-abhängige Expression dereprimierten, aber möglichst noch keine Sekundäreffekte in Mutantenstämmen, wie z.B. ein vermindertes Wachstum durch verringerte Synthese von Sphingolipiden wirksam wurden. Die „Northern blot“ Experimente zeigten, daß *scs2* Mutanten gegenüber dem Wildtyp eine deutlich verringerte Expression von *INO1* wie auch von *OPI3* aufwiesen. Die Deletion von *UBC7* führte ebenfalls zu einer Verringerung der *INO1* und *OPI3* Expression wobei sich die Effekte in *scs2 ubc7* Doppelmutanten addierten. Eine Analyse der *HAC1* mRNA zeigte, daß in den mutierten Stämmen sowohl das Expressionsniveau als auch der Anteil der prozessierten *HAC1-i* mRNA erhöht waren (Abb. 7B).

Um zu untersuchen, ob die Deletion von *SCS2* die Induktion der Expression von Genen der Glycerolipid Biosynthese beeinflußt, wurde die Menge an *INO1* und *OPI3* mRNA bestimmt, die zu verschiedenen Zeiten nach einem Umsetzen der Hefen in Inositol-armes Medium vorhanden war. Dabei zeigte sich, daß *scs2* Hefen mit einer vergleichbaren Kinetik wie wt Zellen, aber auf einem deutlich geringeren Expressionsniveau, die Transkription der entsprechenden Gene erhöhten. Außer den genannten Genen wurde auch die mRNA der Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p analysiert. Die Expression von *INO2* wird autoregulatorisch über Ino2p/Ino4p gesteuert (Ashburner und Lopes, 1995), während sich die Menge der *INO4* mRNA bei Inositol-Mangel durch einen post-transkriptionellen Mechanismus erhöht (Robinson und Lopes, 2000). Ähnlich wie bei *INO1* und *OPI3* erhöhte sich die Menge der mRNA von *INO2* und *INO4* in *scs2* Zellen nach einem Umsetzen in Inositol-armes Medium, blieb aber unterhalb des Wildtypniveaus. *scs2* Zellen induzierten unter diesen Bedingungen auch die Prozessierung der *HAC1* mRNA nach einem vergleichbaren Zeitintervall wie wt Zellen, erreichten jedoch beim letzten Zeitwert ein höheres Verhältnis von gespleißter *HAC1-i* mRNA zu nicht prozessiertem *HAC1-u* (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen mit einem UPR-lacZ Reporterplasmid zeigten, daß das Wachstum in Inositol-freiem Kulturmedium in Wildtyp Zellen nur zu einer teilweisen Induktion der UPR führte. In *scs2* Zellen wurde hingegen eine lacZ-Aktivität gemessen, die mit einer Behandlung mit DTT (3mM, 4h) vergleichbar war, bei der die UPR maximal induziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Bei einem weiteren Experiment wurde die *OPI3* mRNA nach Wachstum in Inositol-haltigem Medium (75µM) analysiert. Dabei zeigte sich, daß *scs2* Zellen gegenüber dem

Wildtyp auch bei Inositol-Repression eine verringerte Expression von über Ino2p/Ino4p regulierten Genen der Glycerolipid Synthese aufwiesen. Das gleiche galt auch für *ubc7* Zellen, wobei sich die Effekte in *scs2 ubc7* Mutanten addierten (Abb. 7C).

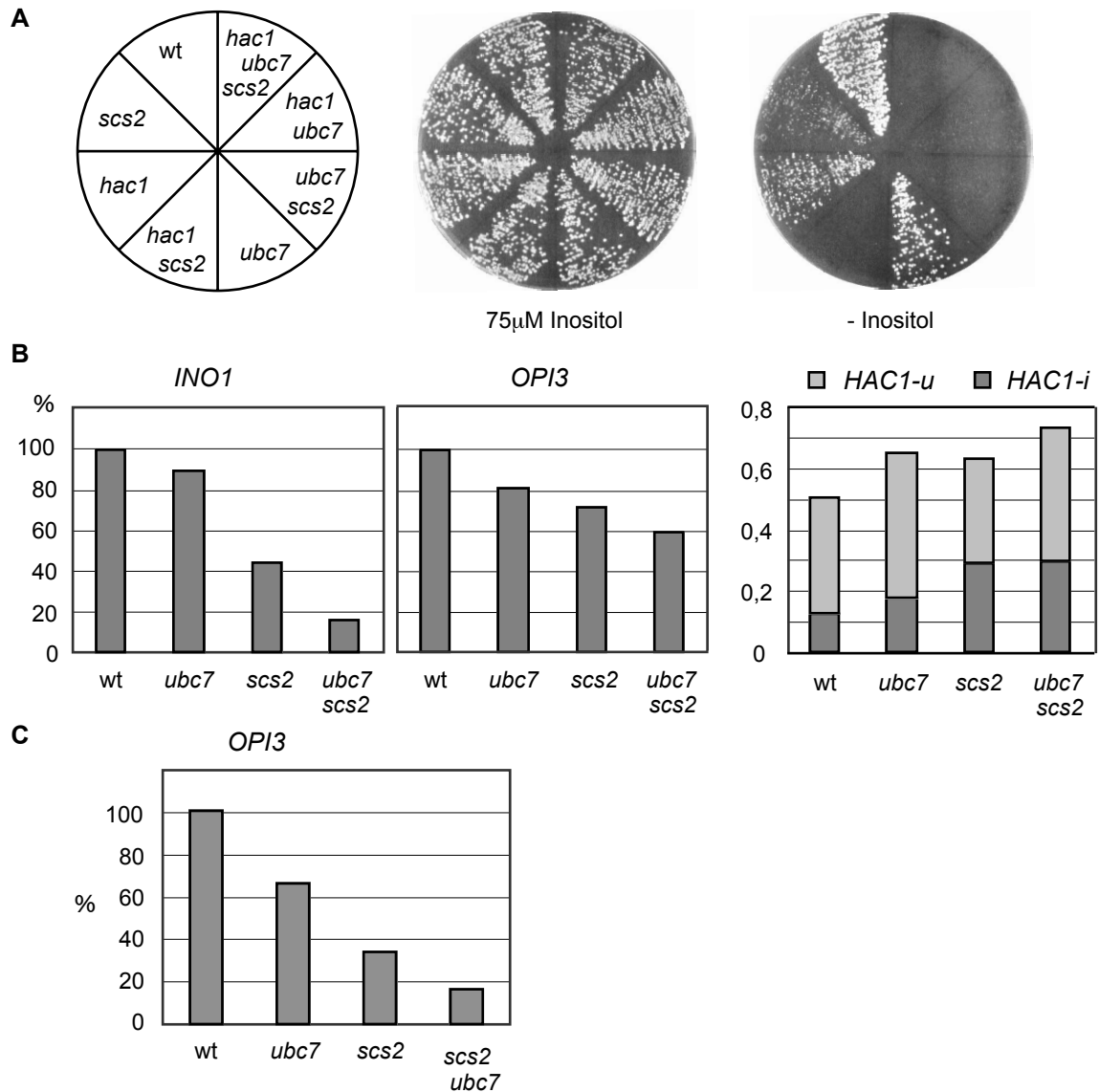


Abb. 7 **A** Inositol-Abhängigkeit von Hefen mit Deletionen in *SCS2*, *HAC1* und *UBC7*. **B** „Northern blot“ Analyse der Expression von *INO1*, *OPI3* und *HAC1* in Zellen mit Deletionen in *SCS2* und *UBC7*, die in Inositol-armem Medium kultiviert wurden. **C** Expression von *OPI3* bei Supplementation des Mediums mit 75µM Inositol.

Diese Experimente zeigen, daß das Fehlen von Scs2p wie auch von Ubc7p zu einem generell verringerten Niveau der Transkription von Genen der Glycerolipid Synthese führt. Dabei erfolgt nach wie vor eine Repression der *OPI3* Expression durch Inositol. Da in *scs2* Zellen auch weniger mRNA der autoreguliert exprimierten Gene *INO2* und *INO4* vorhanden war, beruht die niedrigere Expression von *INO1* und *OPI3* höchstwahrscheinlich auf einer geringeren Aktivierung der über Ino2p/Ino4p regulierten Transkription.

Mutationen in der UPR verstärkten den Inositol-Phänotyp von Stämmen mit Deletionen von *SCS2* und/oder *UBC7*, während andererseits *scs2* und *ubc7* Stämme in Inositol-freiem Medium eine verstärkte Prozessierung der *HAC1* mRNA aufwiesen. Daher wird die Induktion der UPR infolge einer veränderten Lipidzusammensetzung durch diese Gendelektionen nicht negativ beeinflusst, sondern die verstärkte Induktion der UPR in *scs2* und *ubc7* Mutanten supprimiert zum Teil die durch eine niedrigere *INO1* Expression verursachte erhöhte Inositol-Abhängigkeit dieser Stämme.

3.7 Der Einfluß von Scs2p auf den Sphingolipidstoffwechsel

3.7.1 Die Deletion von *SCS2* führt zu einer Sensitivität gegen Aureobasidin A

Ausgehend von der Überlegung, daß in *S. cerevisiae* ein beträchtlicher Teil des neu synthetisierten PI (ca. 60% in Inositol-freiem Medium) für die Synthese von Sphingolipiden verwendet wird und somit der Sphingolipid Stoffwechsel einen Einfluß auf die Regulation der Inositol Synthese haben könnte, wurde die Wirkung von Aureobasidin A (AbA), eines Inhibitors der IPC Synthase (Nagiec et al., 1997), auf das Wachstum verschiedener Mutanten analysiert.

Dabei zeigte sich, daß *scs2* Stämme in Inositol-armem (6µM) wie auch in Inositol-reichem Medium (75µM) eine erhöhte Sensitivität gegenüber AbA aufwiesen (Abb. 8). Um zu untersuchen, ob dieses eine Folge der verminderten Expression von Genen der Lipidbiosynthese in *scs2* Mutanten ist, wurden die Gene der beiden Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p deletiert. In den so erhaltenen Stämmen ist die Regulation des Glycerolipid Stoffwechsels durch Inositol und Cholin weitestgehend ausgeschaltet, und die Expression der verschiedenen Enzyme erfolgt entsprechend der basalen Aktivität der jeweiligen Promotoren. Für ein normales Wachstum dieser Zellen muß dem Medium neben Inositol auch Cholin zugesetzt werden. (Abgesehen von Zellen mit einem *ino2* oder *ino4* Genotyp hatte die Supplementation mit Cholin keinen Einfluß auf die in dieser Arbeit beschriebenen Wachstumsversuche).

Wurden in wt bzw. *scs2* Hefen die Gene *INO2* oder *INO4* zerstört, zeigten die so konstruierten Stämme in einem Medium mit 75µM Inositol eine AbA-Sensitivität wie die entsprechenden Ausgangsstämme (Abb. 8B). In Inositol-armem Medium (6µM) hingegen führten diese Gendelektionen ebenfalls zu einer erhöhten Toxizität von AbA, die sich zu der durch *scs2* verursachten addierte (Daten nicht gezeigt).

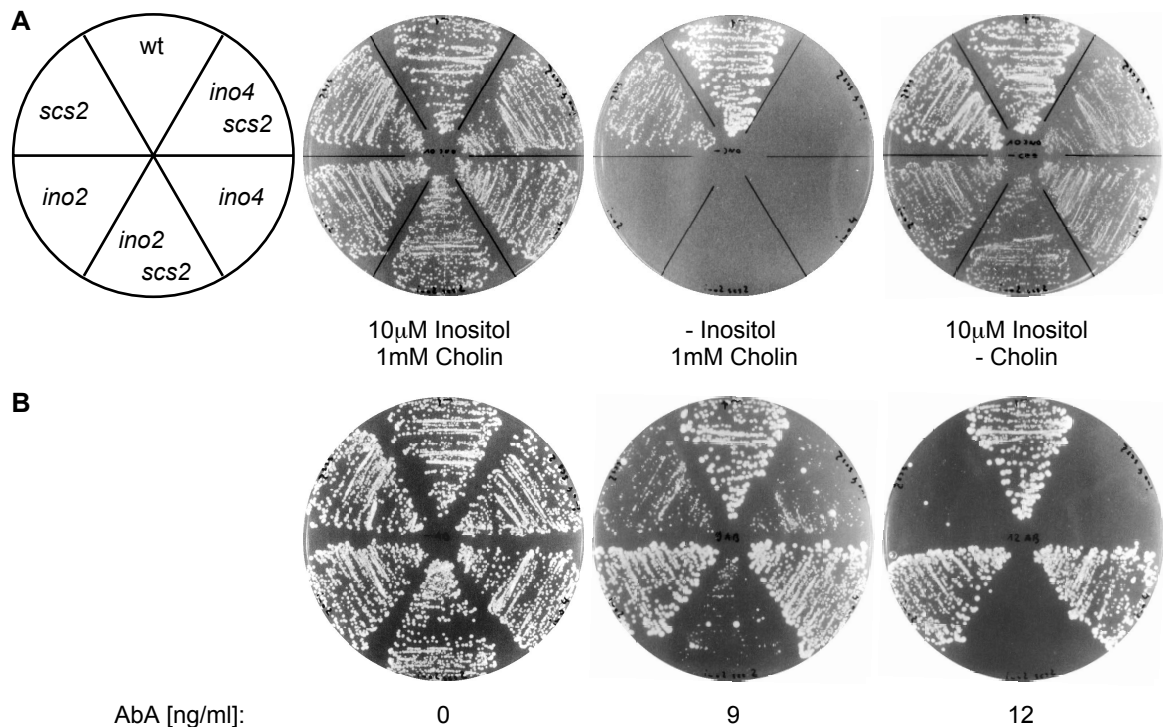


Abb. 8 **A** Abhängigkeit von Stämmen mit Deletionen der Gene *SCS2*, *INO2* und *INO4* von der Zugabe von Inositol und Cholin zum Medium. **B** Sensitivität dieser Stämme gegen Aureobasidin A (AbA) in mit 1mM Cholin und 75μM Inositol supplementiertem Medium.

Beim Wachstumstest auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inositol zeigte sich ein erhöhter Inositol-Bedarf von *scs2 ino2* bzw. *scs2 ino4* Doppelmutanten gegenüber *ino2* oder *ino4* Stämmen. Zwischen *ino2* und *ino4* wurden dabei keine Unterschiede festgestellt. Auch eine *ino2 ire1* Doppelmutante benötigte eine höhere Supplementierung als *ino2* Zellen (Daten nicht gezeigt). Die zusätzliche Deletion von *SCS2* verstärkte nicht die Cholin-Abhängigkeit von *ino2* Mutanten in Medium mit 15μM Inositol (Abb. 8A).

Aus diesen Experimenten ergibt sich, daß die AbA-Sensitivität von *scs2* Mutanten in Inositol/Cholin-reichem Medium auch in Abwesenheit der Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p besteht. Scs2p hat demnach einen Einfluß auf den Sphingolipid Stoffwechsel, der von einer möglichen Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkriptionsregulation von Enzymen dieses Weges unabhängig ist. Auch ein in der Literatur diskutierter Komplex von Ino4p mit einem anderen Transkriptionsfaktor als Ino2p (Robinson und Lopes, 2000) kann nicht für diesen *scs2* Phänotyp verantwortlich sein. Da *wt* und *ino2* Zellen in Inositol-reichem Medium eine vergleichbare AbA-Sensitivität aufwiesen, lassen sich unter diesen Bedingungen Auswirkungen von Mutationen oder Inhibitoren auf den Sphingolipid Stoffwechsel nachweisen, die von der Transkriptionsregulation des Glycerolipid Stoffwechsels unabhängig sind. Die Ino2p/Ino4p-abhängige Genexpression ist dann reprimiert und PI nicht limitierend für die IPC

Synthese. In Inositol-armem Medium, wenn die zelluläre Inositol Synthese normalerweise induziert würde, beeinflußt hingegen in Mutanten, in denen die *INO1* Expression verringert ist, auch der geringere PI Gehalt die Synthese von IPC. Das gleiche gilt, wenn der PI Gehalt der Membranen aufgrund anderer Ursachen verringert ist (etwa durch eine verminderte Inositol-Aufnahme oder PI Synthese Aktivität). Der erhöhte Inositol-Bedarf von *scs2 ino2* Zellen gegenüber *ino2* Hefen erklärt sich wahrscheinlich aus der durch die Deletion von *SCS2* beeinträchtigten Synthese von Sphingolipiden. *ino2 ire1* Mutanten benötigen vermutlich auf Grund der fehlenden Induktion von Chaperonen einen höheren PI Gehalt als *ino2* Hefen. Demnach müssen Mutationen, die zu einer erhöhten Inositol-Abhängigkeit führen, nicht unbedingt die Transkriptionsregulation der Inositol Synthese beeinträchtigen.

Der Vergleich der Abhängigkeit von *ino2* und *ino2 scs2* Hefen von einer Zugabe von Cholin zum Kulturmedium zeigt, daß ein Fehlen von Scs2p, abgesehen von der geringeren Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkription von Enzymen der Glycerolipid Synthese, die Synthese von Aminoglycerolipiden nicht über einen anderweitigen Mechanismus vermindert.

3.7.2 Der Einfluß des potentiellen Homologen von Scs2p

Das Genom von *S. cerevisiae* enthält einen Sequenzabschnitt *Ybl091c-a* (SGD), der transkribiert wird und für eine Aminosäurefolge mit Homologie zu Scs2p kodiert (Nikawa et al., 1995). Allerdings existiert in dieser Sequenz kein geeignetes Startkodon, so daß es sich hierbei möglicherweise um ein Pseudogen handelt. Um die Sequenz dieses Abschnittes zu überprüfen, wurde der entsprechende Bereich mittels PCR aus genomischer DNA von DF5 und W303 Hefen amplifiziert und die entstandenen Fragmente sequenziert (MWG Biotech). Dabei bestätigte sich in beiden Stämmen die publizierte Sequenz.

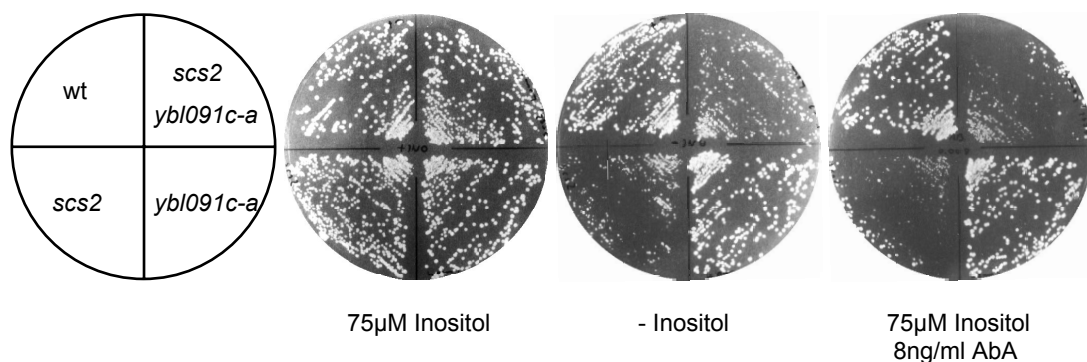


Abb. 9 Die Deletion von *Ybl091c-a*, einer Sequenz mit Homologie zu *SCS2*, beeinflußt weder die Inositol-Abhängigkeit noch die AbA-Sensitivität von wt und *scs2* Zellen.

Um zu testen, ob Scs2p möglicherweise gemeinsam mit seinem potentiellen Homologen eine essentielle Funktion erfüllt, wurde *Ybl091c-a* in wt und *scs2* Hefen deletiert.

Die so entstandenen Mutanten wiesen gegenüber den Ausgangstämmen keinen erkennbaren Phänotyp auf und verhielten sich auch in Hinblick auf Inositol-Abhängigkeit und AbA-Sensitivität wie diese (Abb. 9).

3.7.3 Deletionen von *HAC1* oder *UBC7* erhöhen nicht die Sensitivität gegen Aureobasidin A

Um zu testen, ob die erhöhte Toxizität von AbA spezifisch für *scs2* Mutanten ist, wurde auch das Wachstum von Stämmen mit Deletionen in *UBC7* bzw. *HAC1* auf AbA-haltigem Kulturmedium untersucht. Weder die Einzelmутanten noch die *ubc7 hac1* Doppelmutante zeigten gegenüber dem Wildtyp eine veränderte Empfindlichkeit. Zusammen mit *scs2* ergaben sie eine Sensitivität wie *scs2* allein (Daten nicht gezeigt). Daher ist die AbA-Sensitivität nicht generell mit einer verminderten Induktion der *INO1* Expression verbunden. Auch das Fehlen von Cue1p blieb ohne Effekt, so daß die mutmaßliche Assoziation dieses Proteins zu Scs2p für diesen Phänotyp ohne Bedeutung ist.

3.7.4 Die Auswirkungen von Veränderungen im Sphingosin-Phosphat Stoffwechsel

Zur weiteren Charakterisierung der Auswirkungen der *scs2* Deletion auf den Sphingolipid Stoffwechsel wurden in verschiedenen Kombinationen die Gene einer Sphingosin Kinase (Lcb4p) und einer Sphingosin-P Phosphatase (Lcb3p) deletiert. Beide Proteine sind unter den Untersuchungsbedingungen für den überwiegenden Teil der jeweiligen enzymatischen Aktivität verantwortlich, während die Isoenzyme Lcb5p bzw. Ysr3p nur eine untergeordnete Rolle spielen (Mao et al., 1999; Nagiec et al., 1998; Qie et al., 1997). Lcb4p ist für ca. 95% der Sphingosin Kinase Aktivität der Zelle verantwortlich, so daß in *lcb4* Zellen nur eine sehr geringe Synthese von Sphingosin-P stattfindet und fast das gesamte von der Zelle produzierte Sphingosin zur Synthese von Ceramid verwendet wird. *lcb3* Mutanten enthalten eine erhöhte Konzentration an Sphingosin-P, während die Konzentrationen von Sphingosin und Ceramid vermindert sind (Mao et al., 1999).

Eine Deletion von *LCB4* hatte keinen Einfluß auf die Inositol-Abhängigkeit oder AbA-Sensitivität von wt oder *scs2* Hefen. *lcb3* Mutanten benötigten ebenfalls keine Zugabe von Inositol zum Medium, wiesen aber eine leicht erhöhte Sensitivität gegen AbA auf. Die Inositol-Abhängigkeit und AbA-Sensitivität von *scs2 lcb3* Doppelmutanten war gegenüber der von *scs2* Zellen stark erhöht. Wurde in *lcb3* bzw. *lcb3 scs2* Stämmen zusätzlich das Gen der Sphingosin Kinase Lcb4p zerstört, verhielten sich die so konstruierten *lcb3 lcb4* bzw. *scs2*

lcb3 lcb4 Hefen wie wt bzw. *scs2* Zellen. (Abb. 10). Alle genannten Stämme zeigten ein normales Wachstum in mit Inositol supplementiertem Medium (75µM).

Eine Überexpression von Lcb4p von einem „multi-copy“ Plasmid (pJU468), die eine erhöhte Synthese von Sphingosin-P verursacht, führte in *lcb3* Mutanten zu einem Wachstumsphänotyp auf Inositol-freiem Medium und verstärkte die Inositol-Abhängigkeit von *scs2* Mutanten, beeinflusste aber kaum die AbA-Sensitivität von *lcb3* oder *scs2 lcb3* Mutanten (Daten nicht gezeigt).

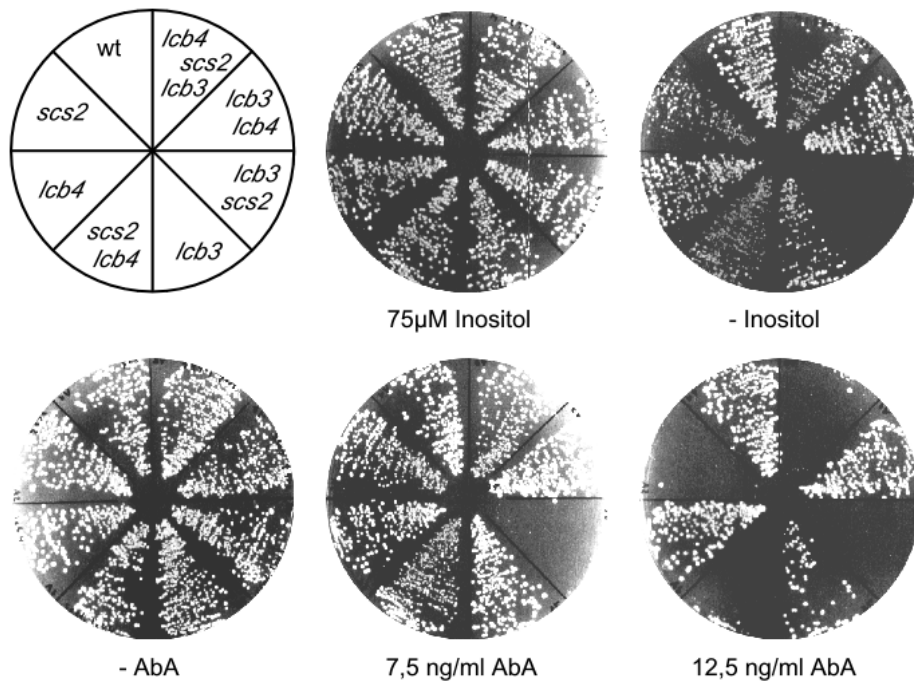


Abb. 10 Die Deletion von *LCB3* verstärkt die Inositol-Abhängigkeit und AbA-Sensitivität von *scs2* Zellen. Eine zusätzliche Deletion von *LCB4* komplementiert den *lcb3* Phänotyp.

Wenn die Gene *SCS2*, *LCB3* und *HAC1* in allen möglichen Kombinationen deletiert wurden, verstärkte sich die Inositol-Abhängigkeit aller Einzelmutationen additiv (Abb. 11A). Auch das Wachstum von *lcb3 ubc7* Doppelmutanten war in Inositol-freiem Medium verlangsamt, während die Einzelmutationen keine Supplementation des Mediums mit Inositol benötigten (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die höhere Inositol-Abhängigkeit von Stämmen, in denen Lcb3p fehlt, auf einer geringeren Expression von Genen der Glycerolipid Synthese beruht, wurde in „Northern blot“ Experimenten die Expression von *INO1* und *OPI3* nach einem Wachstum in Inositol-armem Medium analysiert. Dabei zeigte sich, daß eine Deletion von *LCB3* ebenso wie die von *SCS2* oder *HAC1* zu einer verringerten Transkription dieser Gene führte, wobei sich die Einflüsse der Einzelmutationen gegenseitig verstärkten. In *scs2 lcb3 hac1* Mutanten war nur noch eine sehr geringe Menge an *INO1* mRNA nachweisbar (Abb. 11B).

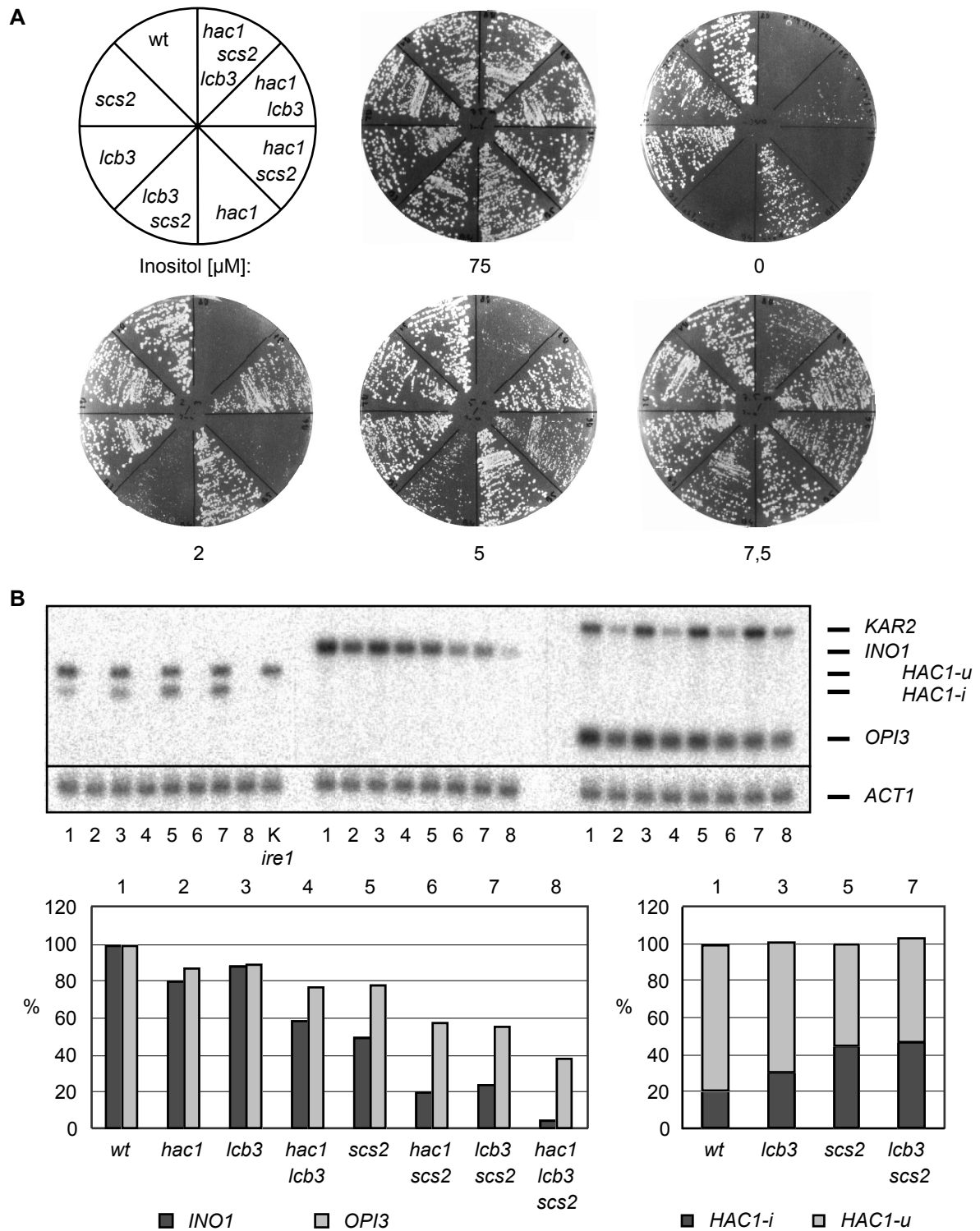


Abb. 11 **A** *scs2*, *lcb3* und *hac1* Deletionen erhöhen additiv die Abhängigkeit von dem Medium zugesetztem Inositol. **B** „Northern blot“ Analyse der Expression von *INO1*, *OPI3* und *KAR2* sowie der Prozessierung von *HAC1*. Die Quantifizierung zeigt die Expressionshöhe relativ zu Aktin (*ACT1*) und zum wt Wert (Mittelwert aus zwei Experimenten mit gleichartigem Ergebnis).

Die Prozessierung der *HAC1* mRNA war dabei in *lcb3* Zellen gegenüber dem wt leicht erhöht, während sie in *scs2* oder *scs2 lcb3* Hefen einen Maximalwert erreichte (Abb. 11B).

Eine zusätzliche Deletion von *LCB4* hob den Effekt von *lcb3* auf die Expression von *INO1* und *OPI3* auf (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der Expression von *OPI3* in Inositol-reichem Medium ergab, daß eine Deletion von *LCB3*, genau wie die von *SCS2* oder *UBC7*, auch unter Inositol-Repression zu einer geringeren Transkription von Genen der Glycerolipid Synthese führte (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Experimenten ergibt sich, daß die Inositol-Abhängigkeit und AbA- Sensitivität von *scs2* Mutanten nicht durch Veränderungen des Sphingosin-P Stoffwechsels verursacht werden, da das Fehlen der Sphingosin Kinase Lcb4p diese Wachstumseffekte nicht beeinflußt.

Eine durch die *lcb3* Deletion bewirkte verstärkte Synthese von Aminoglycerolipiden aus Sphingosin (über die Sphingosin-P Lyase) auf Kosten der Ceramid Synthese führt zu einer verringerten Kapazität zur IPC Synthese und einer geringeren Expression von *INO1* und *OPI3*. Die Ursache für letzteres könnte in der Akkumulation von Sphingosin-P oder einem seiner Abbauprodukte bestehen oder von den geringeren Konzentrationen an Sphingosin und Ceramid bzw. der verringerten IPC Synthese herrühren. Die supprimierende Mutation *lcb4* hebt alle diese Veränderungen auf.

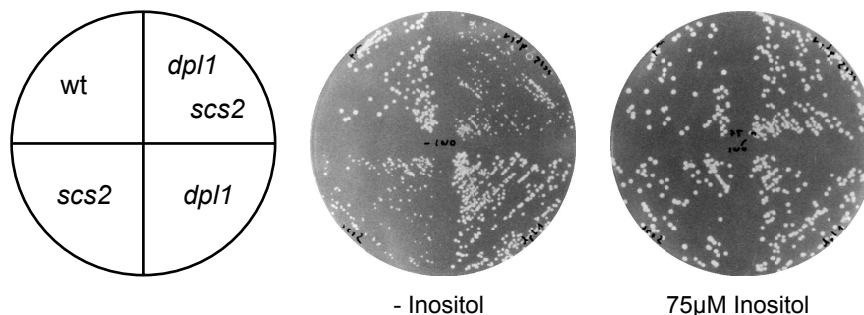


Abb. 12 Das Fehlen der Sphingosin-P Lyase Dpl1p führt nicht zu einer erhöhten Inositol-Abhängigkeit von *scs2* Zellen.

Daher wurde getestet, ob ein Fehlen der Sphingosin-P Lyase Dpl1p das Wachstumsverhalten von *scs2* Zellen auf Inositol-freiem Medium beeinflußt. *dpl1* Zellen akkumulieren wie *lcb3* Mutanten Sphingosin-P, produzieren aber keine Abbauprodukte von Sphingosin-P und enthalten keine verringerten Konzentrationen an Sphingosin, Ceramid oder komplexen Sphingolipiden (Saba et al., 1997).

dpl1 bzw. *dpl1 scs2* Stämme wiesen eine vergleichbare Inositol-Abhängigkeit auf wie *wt* bzw. *scs2* Zellen (Abb. 12). Die Konstruktion von *lcb3 dpl1* Doppelmutanten mißlang, vermutlich auf Grund der Toxizität der extrem hohen Sphingosin-P Konzentration in diesen Stämmen (Kim et al., 2000). Der Befund, daß eine Deletion von *DPL1* die Inositol-Abhängigkeit von *wt* und *scs2* Zellen nicht erhöhte, spricht gegen einen negativen Einfluß von Sphingosin-P auf die *INO1* Expression. Die Zugabe von Phytosphingosin (25µM) zum

Medium und ein dadurch verursachter verstärkter Abbau von Sphingosin-P über Dpl1p führten nicht zu einer verminderten *INO1* Expression und gaben daher ebenfalls keinen Hinweis auf eine regulatorische Funktion von Sphingosin-P oder dessen Abbauprodukten (Daten nicht gezeigt).

Daher sind die niedrigen Konzentrationen der Zwischenprodukte Sphingosin oder Ceramid bzw. ein geringerer Gehalt der Zelle an komplexen Sphingolipiden verantwortlich für die verringerte *INO1* Expression in *lcb3* Mutanten. Eine wichtige Frage, die sich aus diesen Experimenten ergibt, ist, ob sich die Effekte von *scs2* und *lcb3* auf AbA-Sensitivität und Inositol-Abhängigkeit auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus zurückführen lassen.

3.7.5 *scs2* Mutanten sind sensitiv gegen Myriocin und Australifungin

Im folgenden wurde auch das Wachstum verschiedener Hefestämme in Gegenwart von Inhibitoren anderer Schritte des Sphingolipid Stoffwechsels untersucht. Zum einen wurde Myriocin verwendet, ein Inhibitor der Ketosphinganin Synthase, die den ersten Schritt der Sphingosin Biosynthese katalysiert (van den hazel Miyake et al., 1995). Zum anderen wurde die Sensitivität gegen Australifungin, einen irreversibel wirkenden Inhibitor der Ceramid Synthase (Mandala et al., 1995), getestet.

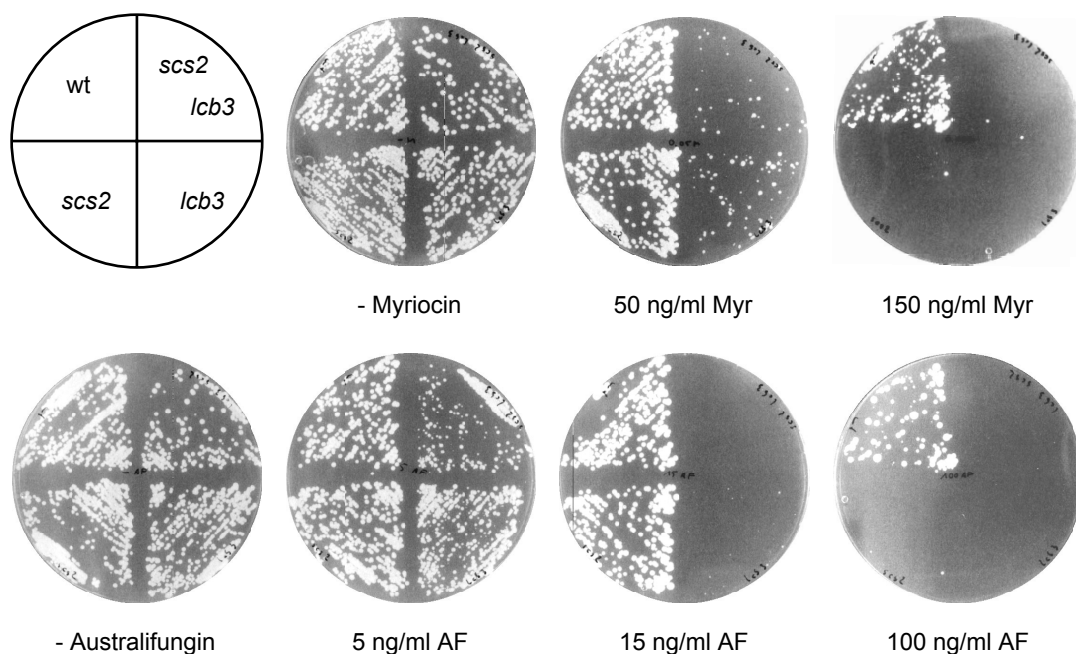


Abb. 13 Vergleich der Sensitivität von *scs2* und *lcb3* Mutanten gegen Inhibitoren der Sphingosin (Myriocin) bzw. Ceramid Synthese (Australifungin).

scs2 Zellen zeigten, verglichen mit dem Wildtyp, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber beiden Substanzen. *lcb3* Mutanten hingegen erwiesen sich als hochgradig sensitiv, wobei eine zusätzliche Deletion in *SCS2* zu einer geringen Verstärkung dieses Phänotyps führte.

Zum Vergleich wurde auch die Sensitivität gegen die Fumonisine B₁ und B₂ analysiert, zwei weitere, mit Australifungin strukturell nicht verwandte Inhibitoren der Ceramid Synthase (Wang et al., 1991). Während Fumonisin B₁, wie publiziert (Wu et al., 1995), nur eine geringe Toxizität gegenüber Hefen hatte, erwies sich das chemisch sehr ähnliche Fumonisin B₂ als deutlich cytotoxisch. Dabei zeigte sich ein analoges Spektrum der Empfindlichkeit der verschiedenen Stämme gegenüber Fumonisin B₂ wie gegenüber Australifungin.

Die hohe Sensitivität der *lcb3* Mutanten gegen Myriocin und Australifungin beruht wahrscheinlich auf einer zentralen Funktion dieses Enzyms bei der Bereitstellung des für die Ceramid Synthase nötigen Sphingosins (Mao et al., 1997). Eine negative Regulation der Lcb3p Aktivität durch Ceramid ist dabei die naheliegenste Hypothese. Wenn die Konzentration von Ceramid niedrig ist, würde so durch eine erhöhte Sphingosin-P Phosphatase Aktivität das Verhältnis von Sphingosin zu Sphingosin-P erhöht und somit mehr Sphingosin für die Ceramid Synthase genutzt werden. Die sehr unterschiedliche Toxizität von Aureobasidin A auf der einen und Myriocin bzw. Australifungin auf der anderen Seite auf *lcb3* und *scs2* Mutanten deutet auf einen Einfluß von Scs2p auf einen späteren Schritt der Sphingolipid Biosynthese hin. Die Funktion von Lcb3p bei der Regulation der zellulären Ceramid Konzentration würde dann durch die Deletion von *SCS2* nicht beeinträchtigt.

3.7.6 Ein erhöhter Ceramid Gehalt komplementiert nicht den *scs2* Phänotyp

Aus den zuvor beschriebenen additiven Effekten von *scs2* und *lcb3* auf AbA-Sensitivität und *INO1* Expression ergab sich die Hypothese, daß Änderungen im Sphingolipid Stoffwechsel die Regulation der Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkription von Genen des Glycolipid Stoffwechsels beeinflussen.

Um zu analysieren, welche Veränderungen des Sphingolipid Stoffwechsels die beobachteten Effekte verursachen könnten, wurden weitere Gene in die Untersuchung einbezogen. Eine Deletion der beiden Ceramidasen Ypc1p und Ydc1p (Mao et al., 2000a; Mao et al., 2000b) in wt bzw. *scs2* Hefen beeinflusste das Wachstum dieser Stämme auf Inositol-freien Platten nicht und führte nur zu einer geringfügig erhöhten Resistenz gegenüber AbA (Abb. 14A). „Northern blot“ Experimente von in Inositol-armem Medium kultivierten Zellen zeigten, daß die Deletion der beiden Ceramidasen im Wildtyp zu einer leichten Verringerung der *INO1* und *OPI3* Expression führte, während sie in *scs2* Zellen ohne Effekt blieb (Abb.14B).

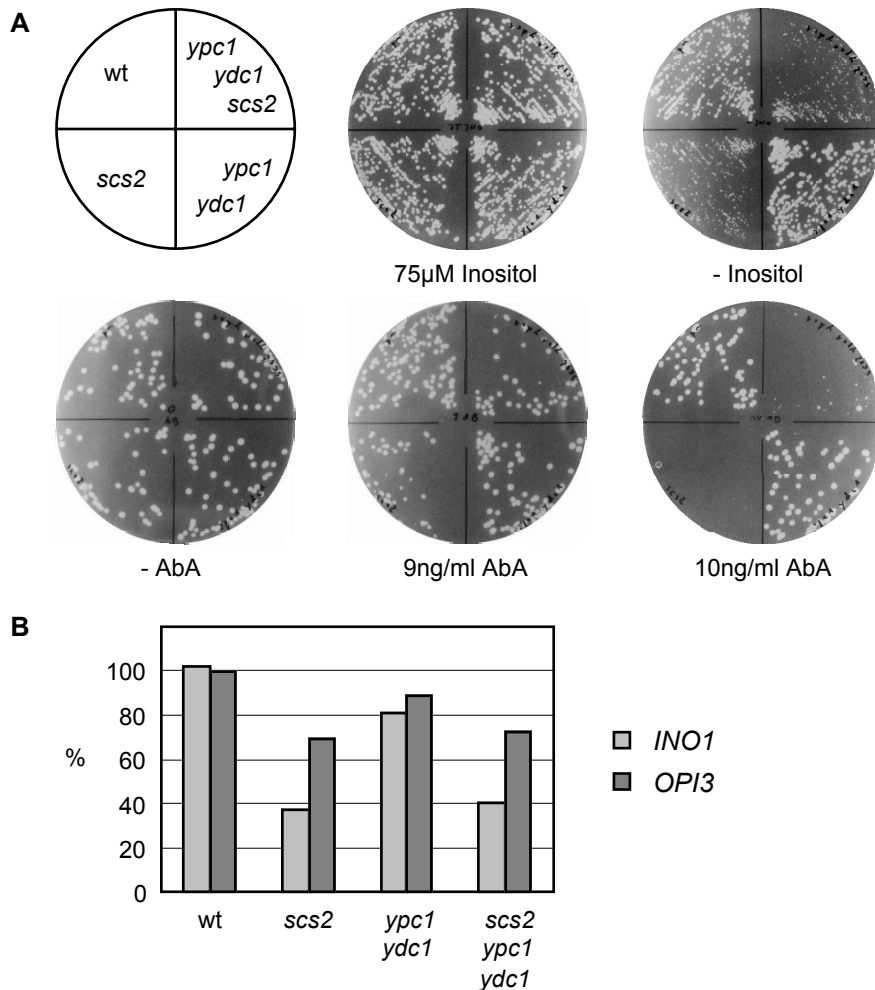


Abb. 14 **A** Ein Fehlen der beiden Ceramidasen Ypc1p und Ydc1p führt nicht zu einer veränderten Inositol-Abhängigkeit oder AbA-Sensitivität. **B** Einfluß der Abwesenheit der Ceramidasen auf die Expressionshöhe von *INO1* und *OPI3* in Inositol-armem Medium (Mittelwert von zwei Experimenten).

ypc1 ydc1 und *ypc1 ydc1 scs2* Zellen wiesen, verglichen mit wt bzw. *scs2* Hefen, eine leicht erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Australifungin auf (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht der publizierten reversen Aktivität zumindest eines dieser Enzyme, welches bei einer niedrigen Ceramid Konzentration zu dessen Synthese beiträgt (Mao et al., 2000a).

Die Beobachtung, daß auch eine Deletion der beiden Ceramidasen, die in wt Zellen zu einem erhöhten Ceramid Gehalt führt, höchstens einen minimalen Einfluß auf die AbA-Sensitivität dieser Zellen hatte, deutet darauf hin, daß der Stoffumsatz der IPC Synthase und nicht die Konzentration des Substrates Ceramid limitierend ist. In *scs2* Zellen ist dann Ceramid vermutlich ebenfalls nicht limitierend. Die erhöhte Ceramid Konzentration in *ypc1 ydc1* Mutanten führte nicht zu einer erhöhten *INO1* Expression, wie man vermuten könnte, wenn die verringerte Menge an *INO1* mRNA in *lcb3* Mutanten durch die niedrige Ceramid Konzentration bewirkt würde. Der erhöhte Ceramid Gehalt der Ceramidase Mutanten könnte aber durch Inhibition der Sphingosin-P Phosphatase Lcb3p die Konzen-

tration von Sphingosin senken, so daß die verringerte Expression von *INO1* in *lcb3* und *ypc1 ydc1* Mutanten mit einer Funktion von Sphingosin bei der Regulation der Inositol Synthese konsistent wäre.

3.7.7 Der Einfluß von Hydroxylasen des Sphingolipid Stoffwechsels

Um die Folgen einer veränderten chemischen Zusammensetzung von Sphingosinen und Ceramiden auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen, wurden Stämme konstruiert, in denen die Hydroxylasen des Sphingolipid-Stoffwechsels fehlen. Dies sind die Sphinganine Hydroxylase Sur2p, die Sphinganine (Dihydrosphingosin, DHS) in 4-Hydroxy-Sphinganine (Phytosphingosin, PHS) umwandelt (Haak et al., 1997), und die Ceramid Hydroxylase Scs7p (die gleichartige Bezeichnung wie Scs2p ist zufällig), welche die Fettsäure in Ceramiden (DHS-C₂₆, PHS-C₂₆) modifiziert (zu DHS-C₂₆OH, PHS-C₂₆OH) (Dunn et al., 1998; Haak et al., 1997). *S. cerevisiae* verwendet für die IPC Synthese bevorzugt das Ceramid-C (Cer-C; PHS-C₂₆OH), kann jedoch auch mit jedem der drei anderen Ceramide wachsen.

sur2, *scs7* und *sur2 scs7* Zellen zeigten ein normales Wachstum, welches nicht durch Zugabe von Inositol beeinflusst wurde, und wiesen gegenüber AbA nur eine geringfügig erhöhte Sensitivität auf. In *scs2* Hefen verursachte das Fehlen der Hydroxylasen keine erhöhte AbA-Sensitivität, verstärkte aber die Inositol-Abhängigkeit (Abb. 15A). Um zu untersuchen, ob dies auf einer verringerten Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkription beruht, wurde die Expression von *INO1* und *OPI3* in Inositol-armem Medium analysiert.

Die Deletionen der beiden Hydroxylasen bewirkten nur eine relativ geringe Veränderung der mRNA Mengen, wobei die Expression in *scs7* Stämmen leicht vermindert und in *sur2* oder *sur2 scs7* Stämmen leicht erhöht war. In Kombination mit *scs2* verhielten sich die entsprechenden Stämme wie *scs2* Einzelmutanten (Abb. 15B).

Daher beruht die erhöhte Inositol-Abhängigkeit, die durch die zusätzliche Deletion dieser Enzyme in *scs2* Stämmen hervorgerufen wird, nicht auf einer verringerten *INO1* Expression, sondern vermutlich auf einer verringerten Sphingolipid Synthese, die bei einem niedrigem PI Gehalt der Membranen das Wachstum limitiert. Dies könnte eine Folge des geringeren Ceramidgehaltes dieser Mutanten oder einer geringeren Affinität der IPC Synthase für andere Ceramid Varianten als Ceramid-C sein. Bei einem hohen PI Gehalt der Membranen limitiert der Ceramidgehalt der Zelle die IPC Synthese auch bei einer veränderten Zusammensetzung der Ceramide nicht.

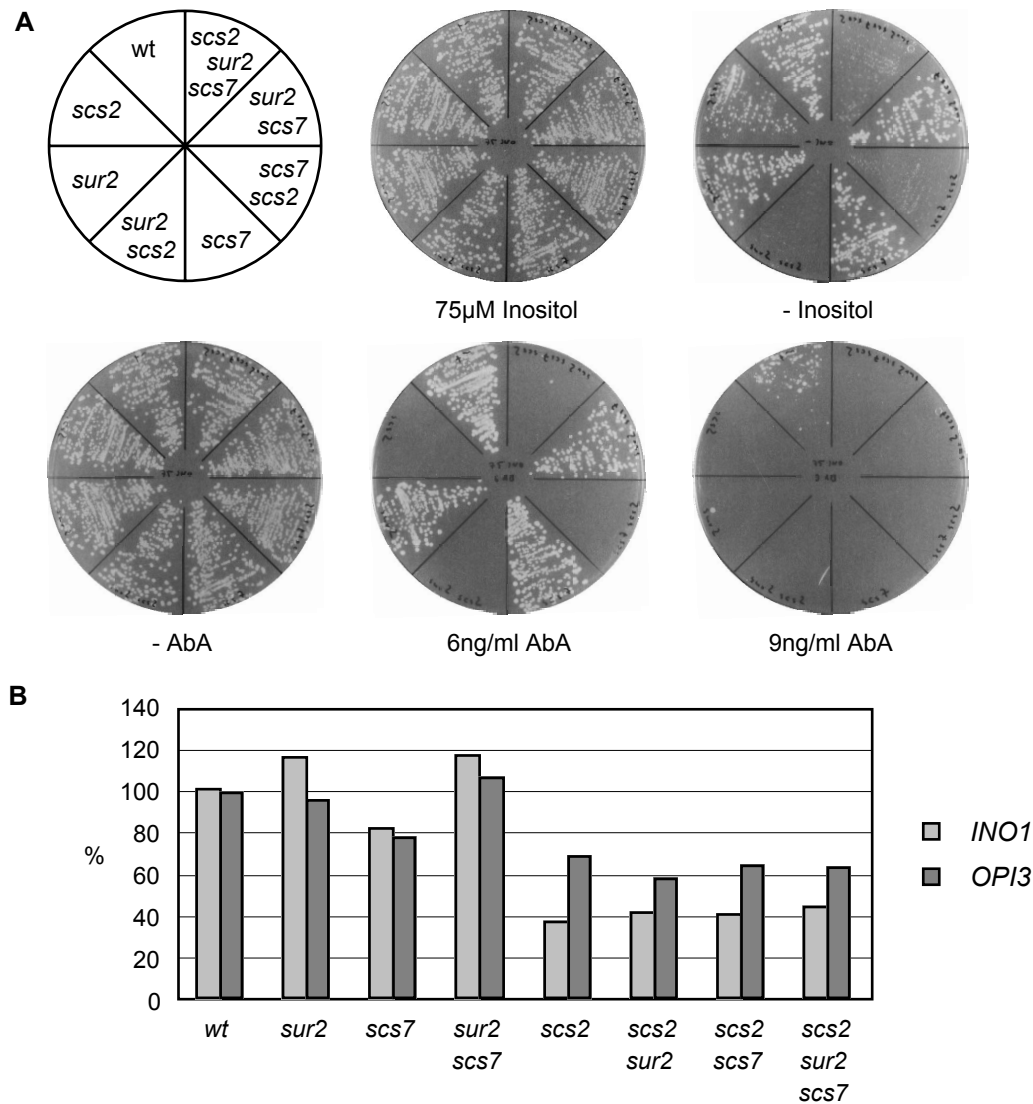


Abb. 15 **A** Inositol-Abhängigkeit und AbA-Sensitivität von Stämmen mit Deletionen in *SCS2*, *SUR2* und *SCS7*. **B** Expression von *INO1* und *OPI3* in diesen Stämmen nach Wachstum in Inositol-armem Medium.

Diese Experimente sprechen nicht für eine mögliche Funktion von Ceramid bei der Transkriptionsregulation der Inositol Synthese, da der Ceramidgehalt durch ein Fehlen der Hydroxylasen verringert wird, Deletionen von *SUR2* oder *SCS7* jedoch unterschiedliche Wirkungen auf die *INO1* Expression haben. *sur2* Mutanten enthalten nur Sphingamin und kein Phytosphingosin. Die erhöhte *INO1* Expression in diesen Stämmen ließe sich daher auch durch einen erhöhten Sphingosin Gehalt erklären, der durch eine niedrigere Affinität der Ceramid Synthase für Sphingamin als Substrat hervorgerufen werden könnte. Die in Abbildung 22 zu beobachtende Akkumulation von Sphingamin-P (DHS-P) in *sur2* Stämmen deutet auf einen erhöhten Sphingamin Gehalt dieser Mutanten hin.

3.7.8 Die Beziehung zwischen Sphingolipid- und Glycerolipid- Stoffwechsel

Eine mögliche Erklärung der in *scs7* Mutanten zu beobachtenden verringerten *INO1* Expression ist, daß eine geringere Synthese von IPC zu einer niedrigeren Inositol Synthese führt. Daher wurde untersucht, ob eine Verringerung der Synthese von Sphingolipiden durch Inhibitoren zu einer veränderten *INO1* Expression führt. Dazu wurden wt Zellen, die in Inositol-armem Medium (10µM) kultiviert wurden, mit Myriocin, Australifungin bzw. Aureo-basidin A behandelt, und die Expression von *INO1*, *OPI3* und *HAC1* in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (Abb. 16).

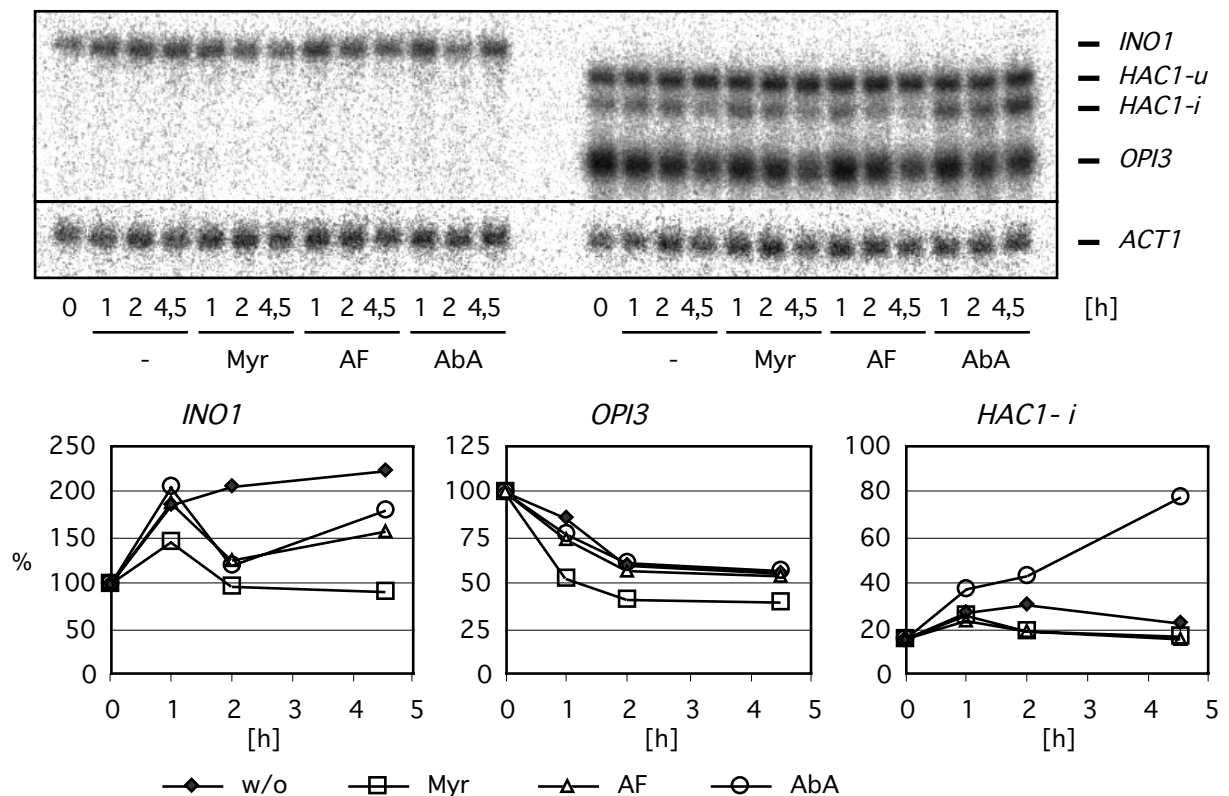


Abb. 16 „Northern blot“ Analyse der Expression von *INO1* und *OPI3* sowie der Prozessierung der *HAC1* mRNA in Wildtyp Zellen in Gegenwart von Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese. Die Zunahme der *INO1* sowie die Abnahme der *OPI3* Expression in unbehandelten Zellen wird durch die Wachstumsphase bedingt.

Die Konzentrationen der Inhibitoren lagen leicht über den bei Wachstumstests auf festen Kulturmedien maximal tolerierten Werten, so daß eine langsame Depletion der Sphingolipide erfolgen sollte. Die Zugabe der Inhibitoren führte zu einer gegenüber der Kontrolle vorübergehend geringeren Expression von *INO1* und *OPI3*. Zum letzten Zeitwert hatten sich die Unterschiede bei Inhibition mit AbA oder Australifungin jedoch ausgeglichen, während die mRNA Menge in Gegenwart von Myriocin über die gesamte Zeit unterhalb des wt Niveaus

blieb. Die Behandlung mit AbA bewirkte beim letzten Zeitwert eine verstärkte Prozessierung der *HAC1* mRNA.

Diese Experimente zeigen, daß eine Verringerung der Synthese von Sphingolipiden nicht zu einer schnellen Erhöhung der Inositol Synthese führt. Ein derartiger Effekt wäre zu erwarten, wenn ein verringerter Gehalt an komplexen Sphingolipiden direkt die *INO1* Expression aktivieren würde. Wahrscheinlich bewirkt der geringere Umsatz von PI und dessen dadurch ansteigende Konzentration zumindest zeitweilig eine Verringerung der Inositol Synthese. Die Induktion der UPR durch AbA ließe sich z.B. durch eine Funktion von komplexen Sphingolipiden für Transportprozesse im sekretorischen Weg erklären. Die Inhibitoren früherer Schritte des Sphingolipidweges führten möglicherweise unter den experimentellen Bedingungen dieser Versuche noch nicht zu einer Depletion der zellulären Sphingolipide. Die beobachtete andauernde Reduktion der *INO1* Expression in Gegenwart von Myriocin steht mit einer Regulation der Synthese von Glycerolipiden durch Sphingosin im Einklang.

3.7.9 Die Auswirkungen eines Fehlens der Sphingolipid Hydrolase

Isc1p ist eine Phospholipase C mit Spezifität für Sphingolipide, die alle komplexen Sphingolipide in *S. cerevisiae* (IPC, MIPC, M(IP)₂C) hydrolysieren kann und für den überwiegenden Teil der in Hefeextrakten meßbaren Sphingomyelase Aktivität verantwortlich ist. Letztere ist stark erhöht, wenn Isc1p von einem „multi-copy“ Plasmid exprimiert wird. Dennoch läßt sich auch unter diesen Bedingungen kein wesentlicher Abbau von Sphingolipiden in *S. cerevisiae* feststellen. Auf Grund dieses Befundes und der Tatsache, daß sich ein verwandtes Enzym in Säugerzellen im Endoplasmatischen Retikulum befindet, wurde auch für Isc1p eine Lokalisation im ER postuliert (Sawai et al., 2000). Dies würde es ermöglichen zu testen, ob die Konzentration von komplexen Sphingolipiden im ER einen Einfluß auf die Regulation des Lipidstoffwechsels hat.

Daher wurde eine Reihe von Stämmen konstruiert, in denen *ISC1* allein oder in Kombination mit *SCS2* und/oder *HAC1* deletiert war. Das Fehlen der Sphingolipid Hydrolase blieb im Plattentest ohne Effekt auf das Wachstum der verschiedenen Stämme auf Inositol-freiem oder AbA-haltigem Kulturmedium. Auch eine Überexpression von Isc1p von einem „multi-copy“ Plasmid in wt, *scs2*, *hac1* und *scs2 hac1* Stämmen bewirkte bei diesen Tests keine veränderte Inositol-Abhängigkeit oder AbA-Sensitivität (Abb. 17).

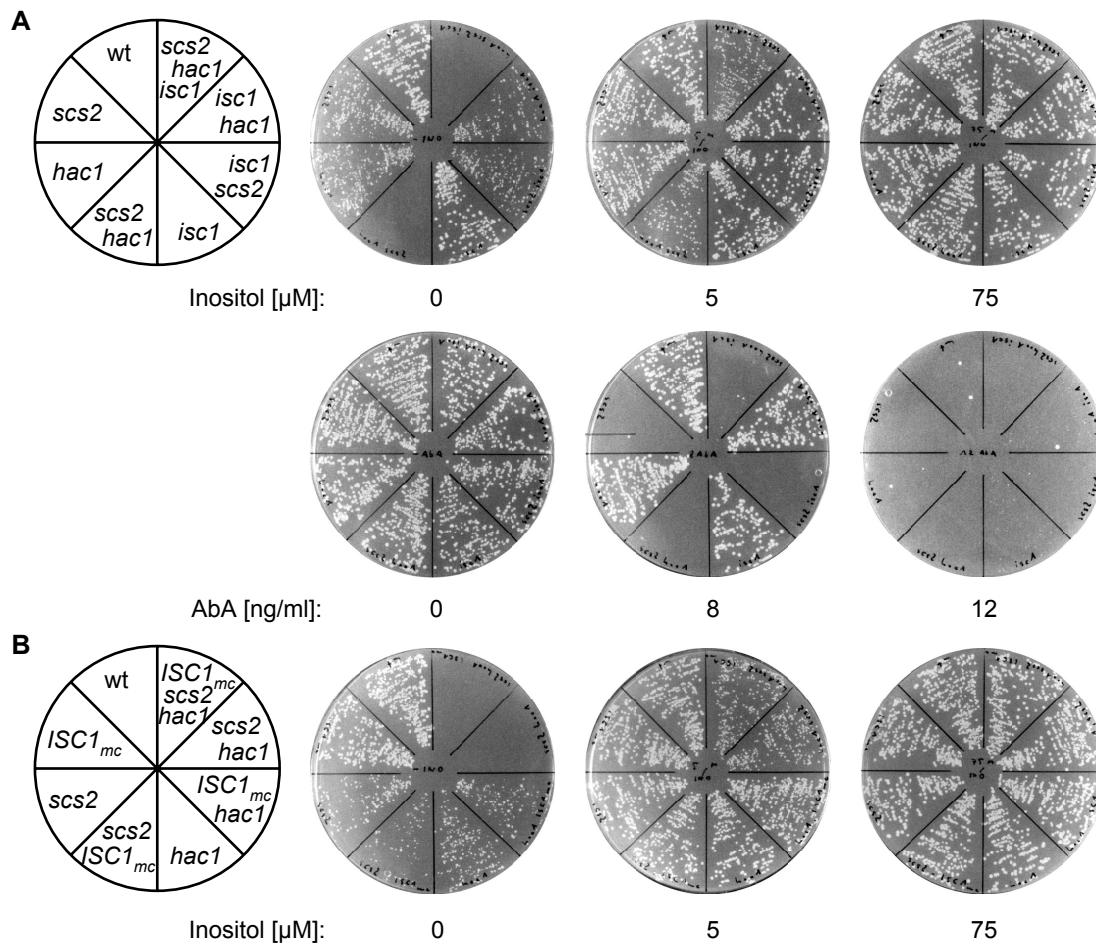


Abb. 17 **A** Die Deletion der Sphingolipid Hydrolase *Isc1p* hat keinen Einfluß auf Inositol-Abhängigkeit und AbA-Sensitivität von *scs2* und *hac1* Stämmen. **B** Eine Expression von *Isc1p* von einem „multi-copy“ Plasmid (*ISC1_{mc}*) verändert die Inositol-Abhängigkeit von *scs2*, *hac1* oder *scs2 hac1* Zellen nicht.

3.7.10 Die Auswirkungen einer erhöhten Expression von *Scs2p*

Da *SCS2* ursprünglich als ein Gen identifiziert wurde, dessen Überexpression die Inositol-Auxotrophie verschiedener Mutanten aufhob, wurde der Einfluß einer erhöhten *Scs2p* Menge untersucht. Wie beschrieben, führte die Expression von *Scs2p* von einem „multi-copy“ Plasmid (pJU344) zu einem verlangsamten Wachstum, wobei sich dieser Effekt bei erhöhter Temperatur verstärkte. Bei einem Experiment in einem anderen genetischen Hintergrund (W303) ließ sich dieser Phänotyp allerdings nicht beobachten.

Die stark erhöhte Expression suppressierte in unserem genetischen Hintergrund nicht die Inositol-Auxotrophie von *hac1* oder *hac1 lcb3* Mutanten und hatte auch keinen Einfluß auf die Toxizität von AbA auf wt oder *lcb3* Zellen. Bei einer Untersuchung der Expression von *INO1* und *OPI3* in Inositol-freiem Medium zeigte sich ein verringertes Niveau gegenüber den Ausgangsstämmen (Daten nicht gezeigt).

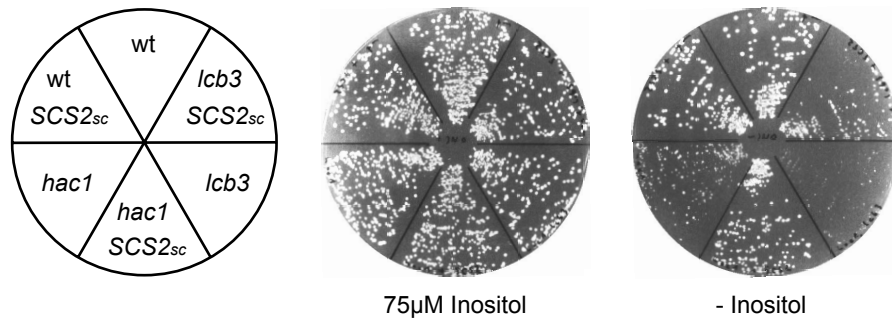


Abb. 18 Die zusätzliche Expression von Scs2p von einem „single-copy“ Plasmid ($SCS2_{sc}$) verringert die Inositol-Abhängigkeit von *hac1* und *hac1 lcb3* Stämmen.

Daher wurde geprüft, ob eine nur geringfügig erhöhte Scs2p Proteinmenge den Lipidstoffwechsel beeinflusst. In der Tat suppressierte die Expression dieses Proteins von einem zusätzlichen „single-copy“ Plasmid (pJU342) die Inositol-Abhängigkeit von *hac1* und *hac1 lcb3* Stämmen (Abb. 18).

Im „Northern blot“ ließ sich dabei eine erhöhte Expression von *INO1* und *OPI3* nachweisen. Bei einem Test auf AbA-Sensitivität zeigte sich kein Einfluß der erhöhten Proteinmenge von Scs2p auf das Wachstum von Wildtyp Zellen. Jedoch bewirkte die leichte Überexpression eine erhöhte Resistenz gegen Fumonisin B₂, so daß auch ein Einfluß auf den Sphingolipid Stoffwechsel zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

Demnach ist der Einfluß von Scs2p auf *INO1* Expression und Sphingolipid-Stoffwechsel von dessen Proteinmenge abhängig, wobei eine hohe Überexpression dieses Proteins je nach verwendetem Stamm zu anderen das Zellwachstum beeinträchtigenden Effekten führt.

3.8 Die Lipidzusammensetzung von *scs2* Zellen

3.8.1 Der Sphingolipidgehalt

Um die Folgen einer Deletion von *SCS2* auf die Lipidzusammensetzung von *S. cerevisiae* zu analysieren, wurden Zellen verschiedener Stämme mit radioaktiven Substanzen (^{33}P , ^3H -Inositol, ^3H -Serin) markiert und Lipidextrakte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Die Zuordnung der einzelnen Banden zu den publizierten Sphingolipiden von *S. cerevisiae* erfolgte durch Vergleich von mit ^{33}P , ^3H -Serin und ^3H -Inositol markierten Lipiden, deren Resistenz gegen Deacylierung und die Analyse von Lipidextrakten aus wt, *sur2*, *scs7* und *sur2 scs7* Stämmen (siehe Abb. 22).

Dabei erlaubte die Situation, daß die komplexen Sphingolipide von *S. cerevisiae* mit ^{33}P markiert werden können und sich alle Glycerolipide mit Methylamin deacylieren lassen, da Hefen keine Alkylipide enthalten (Daum et al., 1998), eine relativ einfache Bestimmung des Anteils der komplexen Sphingolipide an den gesamten Phospholipiden. Da $\text{M(IP)}_2\text{C}$ zwei Phosphatgruppen enthält, wurden dessen Werte halbiert. Für die Gesamtmenge an Phospholipiden ließ sich diese Korrektur vernachlässigen. Andererseits erwiesen sich Untersuchungen des Lipidstoffwechsels dennoch als relativ kompliziert, da ^{33}P und ^3H -Inositol erst in PI inkorporiert werden und dann entsprechend dem Anteil am gesamten PI im Golgi Apparat auf Ceramid übertragen werden. Zudem tolerierten die Hefen nur eine begrenzte Verminderung ihres Sphingolipid Gehaltes und reagierten bei weiterer Reduktion mit einer starken Abnahme der Synthese aller Lipide und Proteine.

Um den Gesamtanteil an Sphingolipiden zu bestimmen, wurden wt, *scs2*, *lcb3* und *scs2 lcb3* Zellen in Inositol-armem ($11\mu\text{M}$) Medium über mehrere Generationen mit ^{33}P markiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert, zur Hälfte deacyliert und Proben mittels DC aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß *scs2* Zellen in Inositol-haltigem Medium ($11\mu\text{M}$) den gleichen Anteil an komplexen Sphingolipiden enthielten wie wt Zellen. In *lcb3* und *lcb3 scs2* Mutanten war der Anteil leicht reduziert (ca. 10%). In Extrakten von Zellen, welche die *lcb3* Deletion enthielten, zeigte sich erwartungsgemäß eine weitere gegen Deacylierung resistente Bande, deren Laufverhalten den publizierten Daten für Sphingosin-P entsprach. Die Deletion von *SCS2* hatte hingegen keinen Einfluß auf die Akkumulation von Sphingosin-Phosphat (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde der Sphingolipidgehalt von wt und *scs2* Zellen analysiert, die in Inositol-freiem oder Inositol-reichem Medium kultiviert worden waren (Abb. 19). Hierbei zeigte sich, daß es in Inositol-freiem Medium zu einer stärkeren Verringerung des Sphingolipidgehaltes in *scs2* Zellen (70%) kam als in wt Hefen (85%), während der Sphingolipidgehalt nach einem Wachstum in Inositol-reichem Medium in beiden Stämmen gleich oder in *scs2* Zellen leicht

erhöht war. Das Spektrum der einzelnen Sphingolipide blieb im wesentlichen unverändert. Nur der Anteil des komplexen Sphingolipids $M(IP)_2C$, das durch eine zweite Übertragung einer Inositol-phosphoryl Gruppe synthetisiert wird, änderte sich entsprechend der Konzentration an PI. In mit $75\mu M$ Inositol supplementiertem Medium enthielten *scs2* Mutanten gegenüber wt Zellen einen vergleichbaren oder leicht erhöhten Anteil an $M(IP)_2C$ wobei sowohl wt als auch *scs2* Zellen einen hohen PI Gehalt der Membran aufwiesen. In Inositol-freiem Medium war der Gehalt an $M(IP)_2C$ wie auch PI in wt Zellen deutlich verringert und in Lipiden aus *scs2* Zellen sehr niedrig.

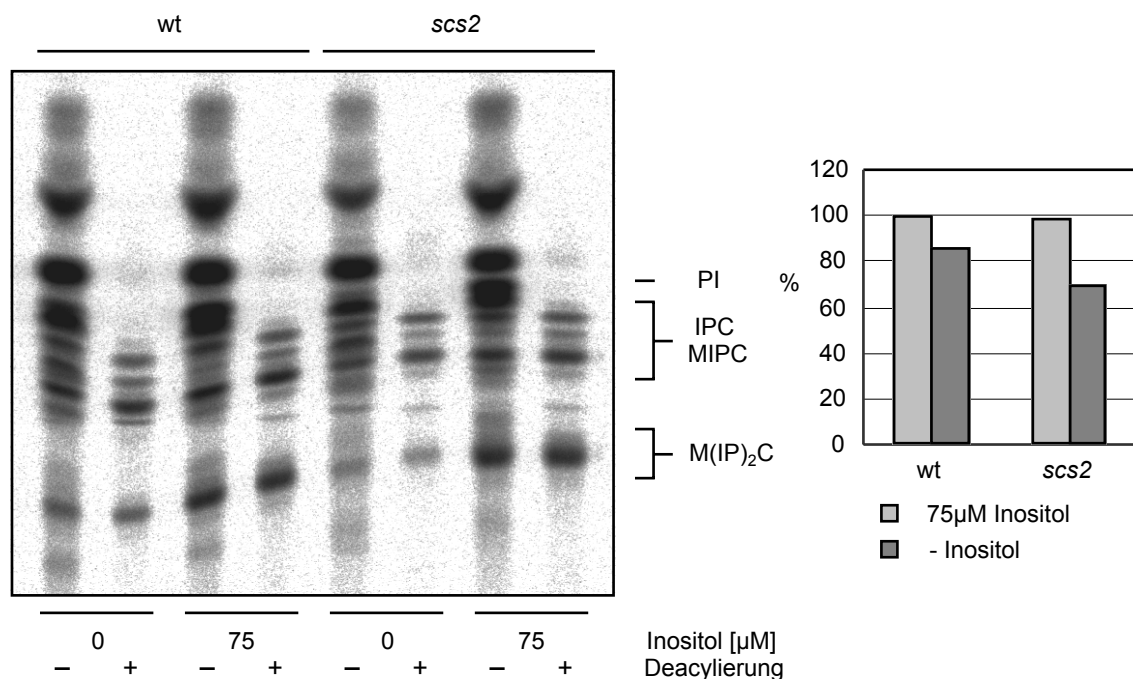


Abb. 19 *scs2* Zellen weisen nach Wachstum in Inositol-freiem Medium einen geringeren Gehalt an Sphingolipiden relativ zu den gesamten Phospholipiden auf als wt Zellen. In mit Inositol supplementiertem Medium ist der Anteil der Sphingolipide in wt und *scs2* Zellen vergleichbar.

Um zu überprüfen, ob die AbA-Sensitivität von *scs2* Mutanten auf einer geringeren Synthese von IPC oder einer höheren Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigen Gehalt an Sphingolipiden beruht, wurde untersucht, wie sich die Zugabe von Aureobasidin A auf den Sphingolipidgehalt auswirkt. Dazu wurden wt und *scs2* Hefen über Nacht in Inositol-reichem Medium ($75\mu M$ Inositol) mit ^{33}P markiert. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und zu einem Teil der Zellen 9ng/ml AbA zugegeben. Diese Konzentration inhibiert im Wachstumstest auf festen Medien das Wachstum von *scs2* Hefen, nicht aber von wt Zellen. Nach weiteren 6 Stunden (bei einer Verdopplung der Zellzahl alle 3 Stunden) wurde der Anteil der Sphingolipide an der Gesamtmenge der Phospholipide bestimmt. Dabei zeigte

sich, daß der Sphingolipidgehalt durch den Inhibitor in *scs2* Zellen stärker reduziert wurde als in wt Zellen (Abb. 20).

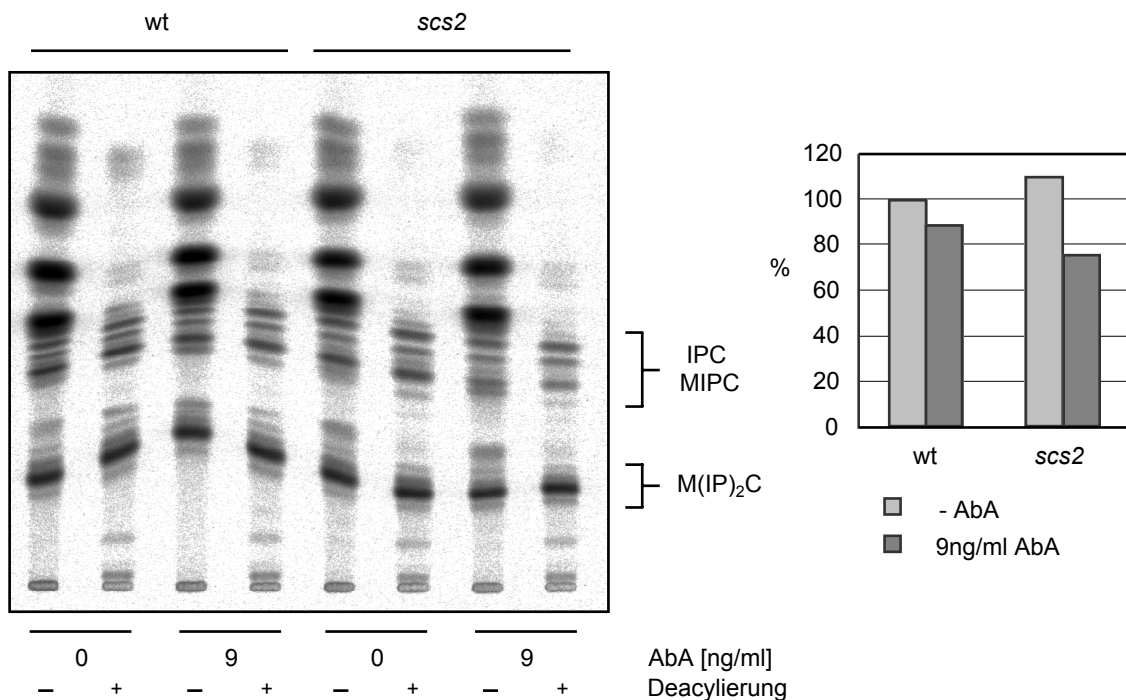


Abb. 20 *scs2* Zellen zeigen nach Behandlung mit intermediären Konzentrationen an AbA (9ng/ml) eine stärkere Abnahme ihres Sphingolipidgehaltes als wt Zellen (Mittelwert zweier Experimente).

Bei einem weiteren Experiment wurde die Stabilität von Sphingolipiden in wt und *scs2* Zellen verglichen. Dazu wurden die Hefen über Nacht mit ³³P markiert, in nicht-radioaktives Medium überführt und die weitere Synthese von komplexen Sphingolipiden mit einer hohen Dosis AbA (1µg/ml) blockiert. Die Bestimmung der nach 2 bzw. 4 Stunden verbliebenen Sphingolipide ergab, daß unter diesen Bedingungen nur ein sehr geringer Abbau der markierten Sphingolipide erfolgte (7-10% nach 4 Stunden), der in *scs2* Mutanten nicht signifikant erhöht war (Abb. 21).

Demzufolge beruht die erhöhte Toxizität von AbA auf *scs2* Mutanten auf einer gegenüber dem wt verringerten IPC Synthese und nicht auf einer geringeren Toleranz gegenüber einem niedrigen Sphingolipid Gehalt. Dabei zeigen *scs2* Zellen in Inositol-haltigem Medium keine verringerte Aufnahme und Inkorporation von Inositol in PI, so daß die beobachtete AbA-Sensitivität in Inositol-reichem Medium nicht auf einen niedrigeren PI Gehalt der Zellen zurückgeführt werden kann. Eine Reduktion des Sphingolipid Gehaltes läßt sich in *scs2* Mutanten allerdings nur beobachten, wenn die Konzentration eines Substrates der IPC Synthase (Ceramid bzw. PI) sehr niedrig ist oder die IPC Synthase Aktivität durch den Inhibitor AbA verringert wird, und beruht daher vermutlich auf einem geringeren Spielraum der Zellen, den Sphingolipid Mangel durch eine Gegenregulation auszugleichen.

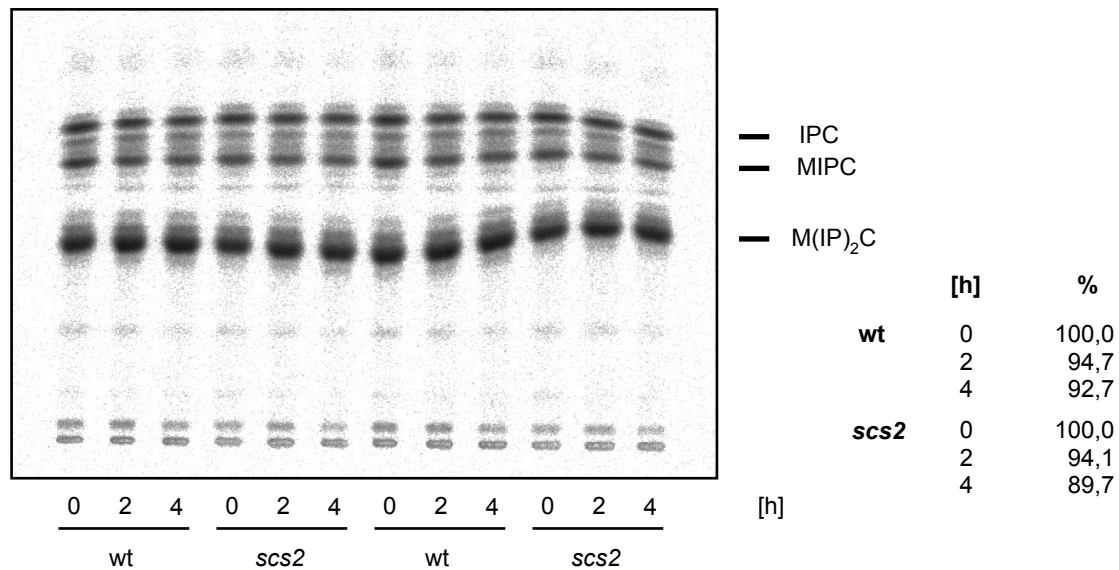


Abb. 21 Stabilität von Sphingolipiden bei vollständiger Inhibition der IPC Synthese durch hohe Konzentrationen an Aureobasidin A (1 µg/ml) (Doppelbestimmung).

Eine Analyse der Lipidzusammensetzung von Scs2p überexprimierenden Zellen zeigte kein verändertes Verhältnis von Sphingo- zu Phospholipiden sowie keine signifikanten Abweichungen im Lipidspektrum der Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher beruht der durch eine starke Überexpression von Scs2p verursachte Wachstumsphänotyp vermutlich nicht auf einem veränderten Lipidstoffwechsel.

3.8.2 Der Ceramidgehalt von *scs2* Zellen

Zur Identifizierung der Ceramide wurden mit ^3H -Serin markierte und deacylierte Lipide verglichen, die aus wt bzw. *scs2* Mutanten mit zusätzlichen Deletionen in den Genen der Hydroxylasen Sur2p und Scs7p präpariert wurden, die zuvor bei 38°C kultiviert wurden, um eine Erhöhung des Ceramidgehaltes zu induzieren (Abb. 22).

Überraschenderweise blieb die obere der beiden in wt Stämmen sichtbaren Hauptbanden mit dem erwarteten Laufverhalten (*), die möglicherweise ebenfalls aus Sphinganin synthetisiert wird, in diesen Stämmen unverändert. Eine derartige Substanz wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Das gleiche gilt für eine zweite, nur in *sur2* Stämmen sichtbare Verbindung (**). Die Konzentration der beiden Ceramide PHS-C₂₆ (Cer-B) und DHS-C₂₆OH (Cer-B') ließ sich daher nicht analysieren. Das Spektrum der komplexen Sphingolipide wie auch der beobachtbaren Ceramide gab jedoch keinen Hinweis auf eine veränderte Ceramid Zusammensetzung in *scs2* Mutanten.

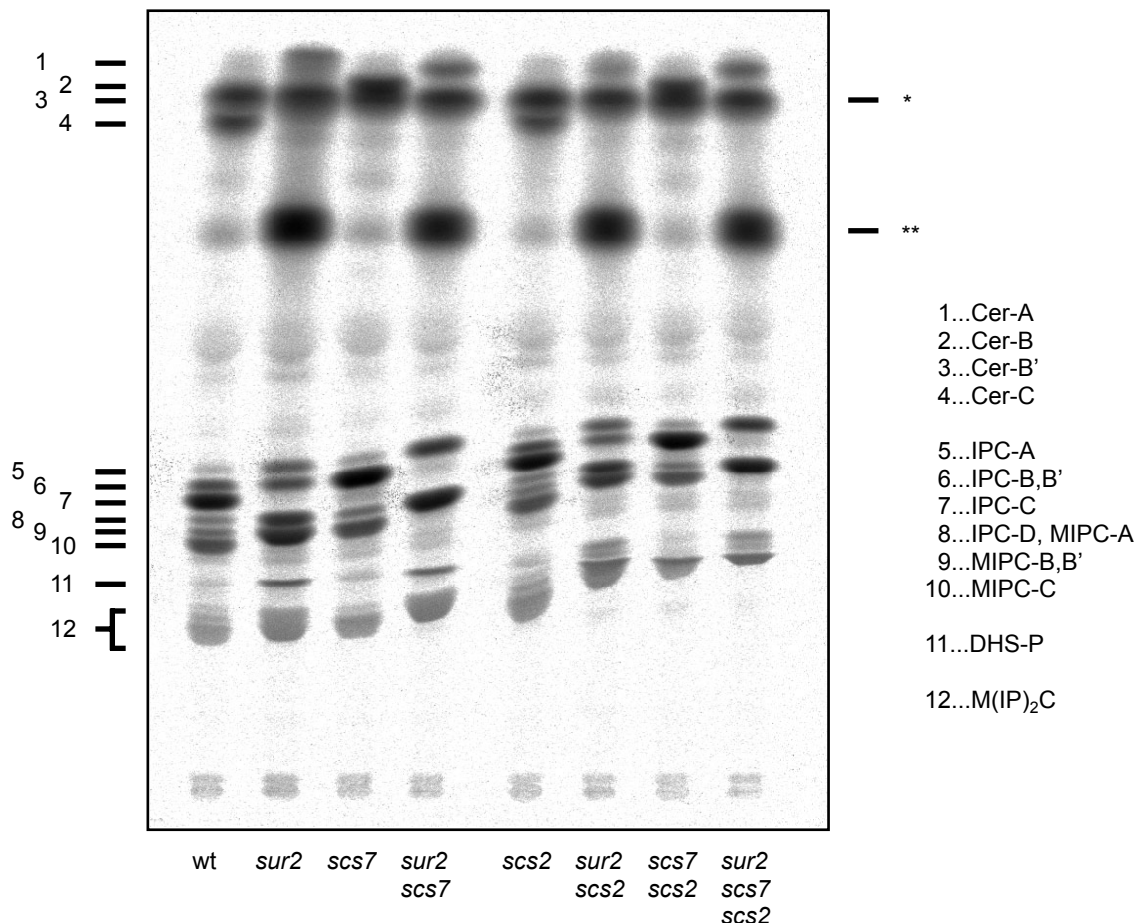


Abb. 22 Analyse der mit ^3H -Serin markierten Sphingolipide von Stämmen mit Deletionen in den Genen *SCS2*, *SUR2* (Sphinganin Hydroxylase) und *SCS7* (Ceramid Hydroxylase). * und ** bezeichnen in der Literatur nicht beschriebene Substanzen. *sur2* Stämme enthalten neben Cer-B (wird durch * verdeckt) auch Cer-A in einer höheren Konzentration. Zuordnung der Lipide nach (Haak et al., 1997).

Daher wurde analysiert, ob in *scs2* Mutanten das Verhältnis des Ceramids PHS- C_{26}OH (Cer-C) zu dem Gesamtgehalt an komplexen Sphingolipiden bei Wachstum in Medien mit oder ohne Inositol Supplementation verändert ist. Zum Vergleich wurde auch ein *lcb3* Stamm analysiert.

Um den Ceramidgehalt der Zellen mittels Dünnschichtchromatographie untersuchen zu können, wurden diese mit ^3H -Serin markiert, das unter anderem als Substrat für die Synthese von Sphingosin verwendet wird. Allerdings läßt sich ein effizienter und über einen bestimmten Zeitraum gleichmäßiger Einbau nur annähernd erreichen, da Serin im Stoffwechsel eine zentrale Position einnimmt und von *S. cerevisiae* in Minimalmedium in großen Mengen verstoffwechselt wurde, ohne daß eine Sättigung der Aufnahmekapazität zu beobachten war. Daher wurde für diese Experimente ein synthetisch komplettes Medium verwendet (SC), das mit einer Reihe von potentiellen Syntheseprodukten dieser Aminosäure sowie einer bestimmten Menge unmarkierten Serins supplementiert war.

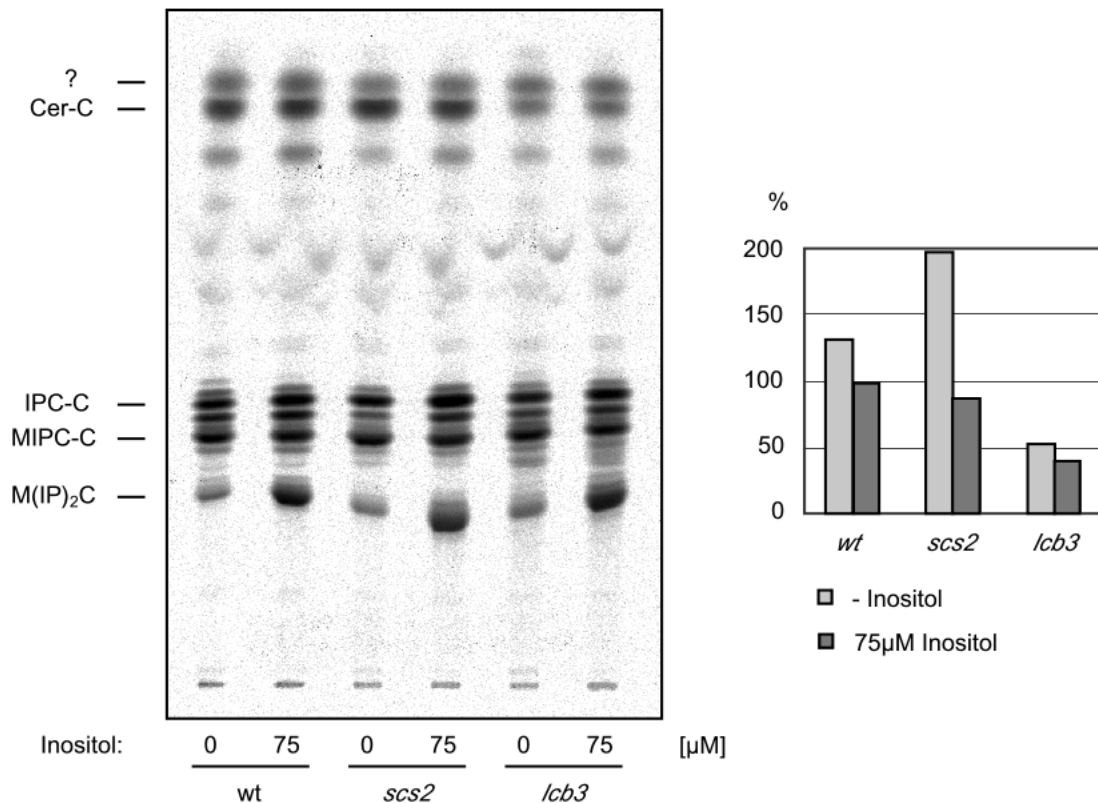


Abb. 23 Analyse des Cer-C Gehaltes relativ zu komplexen Sphingolipiden in *wt*, *scs2* und *lcb3* Hefen nach Wachstum in Inositol-freiem bzw. Inositol-reichem Medium.

scs2 Hefen wiesen nach Wachstum in Medium mit 75μM Inositol eine Relation von Ceramid zu komplexen Sphingolipiden auf wie *wt* Stämme, während die Ceramid Menge in *lcb3* Mutanten deutlich reduziert war. Wurden die Stämme in Inositol-freiem Medium kultiviert, erhöhte sich der Ceramid Anteil in *wt* Zellen nur leicht, in *scs2* Zellen jedoch erheblich, wobei der Einbau von Radioaktivität in komplexe Sphingolipide in *scs2* Zellen stark vermindert war. In *lcb3* Mutanten war die Ceramid Konzentration auch unter diesen Bedingungen deutlich geringer als im Wildtyp. Daher ist der Ceramid Gehalt von *scs2* Hefen nicht verringert, und die AbA-Sensitivität dieser Mutanten läßt sich nicht durch eine fehlende Hochregulation der Ceramid Synthese bei einem verminderten Sphingolipid Gehalt der Zelle erklären. Demnach ist in *scs2* Zellen ein späterer Schritt der Sphingolipid Synthese beeinträchtigt.

3.8.3 Die Auswirkungen einer Deletion von *SCS2* auf den Transport von Ceramid zwischen ER und Golgi Apparat

Kurz vor Abschluß dieser Arbeit wurde publiziert, daß die IPC Synthase entgegen früheren Annahmen nicht im ER, sondern im Golgi Apparat lokalisiert ist. Zudem zeigten die Autoren, daß die Synthese von IPC aufgrund der Topologie des Aur1p Proteins (Untereinheit

der IPC Synthese und mutmaßliche Inositol-phosphoryl Transferase) wahrscheinlich an der lumenalen Seite der Golgi-Membran erfolgt (Levine et al., 2000).

Daraus ergab sich, daß in *scs2* Mutanten auch der Transport der Metabolite PI und Ceramid zum Ort der IPC Synthese beeinträchtigt sein könnte. Dies beträfe zum einen den Transfer von PI und Ceramid zur lumenalen Seite der Membran, zum anderen den Transport von Ceramid zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat. Die Synthese der Vorstufe PI erfolgt zum Teil im Golgi Apparat (Leber et al., 1995).

Wie bereits erwähnt, änderte sich der Anteil von $M(IP)_2C$ an den komplexen Sphingolipiden stark entsprechend dem zellulären PI Gehalt. Eine naheliegende Erklärung dafür wäre, daß die für die Synthese dieser Verbindung verantwortliche Inositol-phosphoryl Transferase Ipt1p (Dickson et al., 1997b), die gleichfalls an der lumenalen Seite der Golgi Membran aktiv ist, eine hohe K_m für PI hat und so bei Inositol-Mangel weniger PI für diese nicht-essentielle Synthese verbraucht wird. *scs2* Mutanten, die in Inositol-reichem Medium kultiviert wurden, enthielten einen hohen Anteil von $M(IP)_2C$, obgleich sie unter diesen Bedingungen eine erhöhte AbA-Sensitivität zeigten. Somit beruht die höhere Toxizität von AbA auf *scs2* Zellen wahrscheinlich nicht auf einer geringeren Verfügbarkeit von PI an der lumenalen Seite der Membran.

Es ist beschrieben worden, daß der Transport von Ceramid vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat unabhängig von den von COP-Komplexen abhängigen vesikulären Transportwegen ist und möglicherweise über Kontaktstellen zwischen ER und cis-Golgi erfolgt (Levine et al., 2000; van Meer und Holthuis, 2000).

Zur Untersuchung einer eventuellen Beteiligung von Scs2p an einem solchen Transportmechanismus wurden Stämme verwendet, die ein temperatursensitives Allel (*sec18-1*) des Hefe NSF („N-ethyl-maleimide sensitive factor“) enthielten. Diese zeigen bereits kurze Zeit nach einem Wechsel von permissiven (25°C) zu restriktiven Bedingungen (38°C) eine vollständige Blockierung des vesikulären Transportes zwischen ER und Golgi Apparat (Morin-Ganet et al., 1998). Sollte eine Deletion von *SCS2* dazu führen, daß Ceramid verstärkt über Sec18p erfordernde Transportwege transportiert werden muß, wäre in *sec18-1 scs2* Doppelmutanten ein synthetischer Phänotyp zu erwarten. *sec18-1 scs2* Zellen zeigten jedoch im Plattentest eine ähnliche Temperatursensitivität wie *sec18-1* Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Doppelmutanten waren im Gegensatz zu *sec18-1* Inositol-auxotroph und AbA-sensitiv. Die Expression von Scs2p von einem „single-copy“ Plasmid (pJU489) suppressierte diesen Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

Wurden diese Mutanten nach einer Vorinkubation unter restriktiven Bedingungen (20min 38°C) mit 3H -Inositol oder 3H -Serin markiert, zeigten sowohl *sec18-1* als auch *sec18-1 scs2* eine Synthese von IPC, wobei sich auch die in der Literatur beschriebene verminderte

Synthese von MIPC und M(IP)₂C beobachten ließ (Abb. 24). Daher ist der Transport von Ceramid vom ER zum Golgi Apparat in *scs2* Mutanten nicht beeinträchtigt.

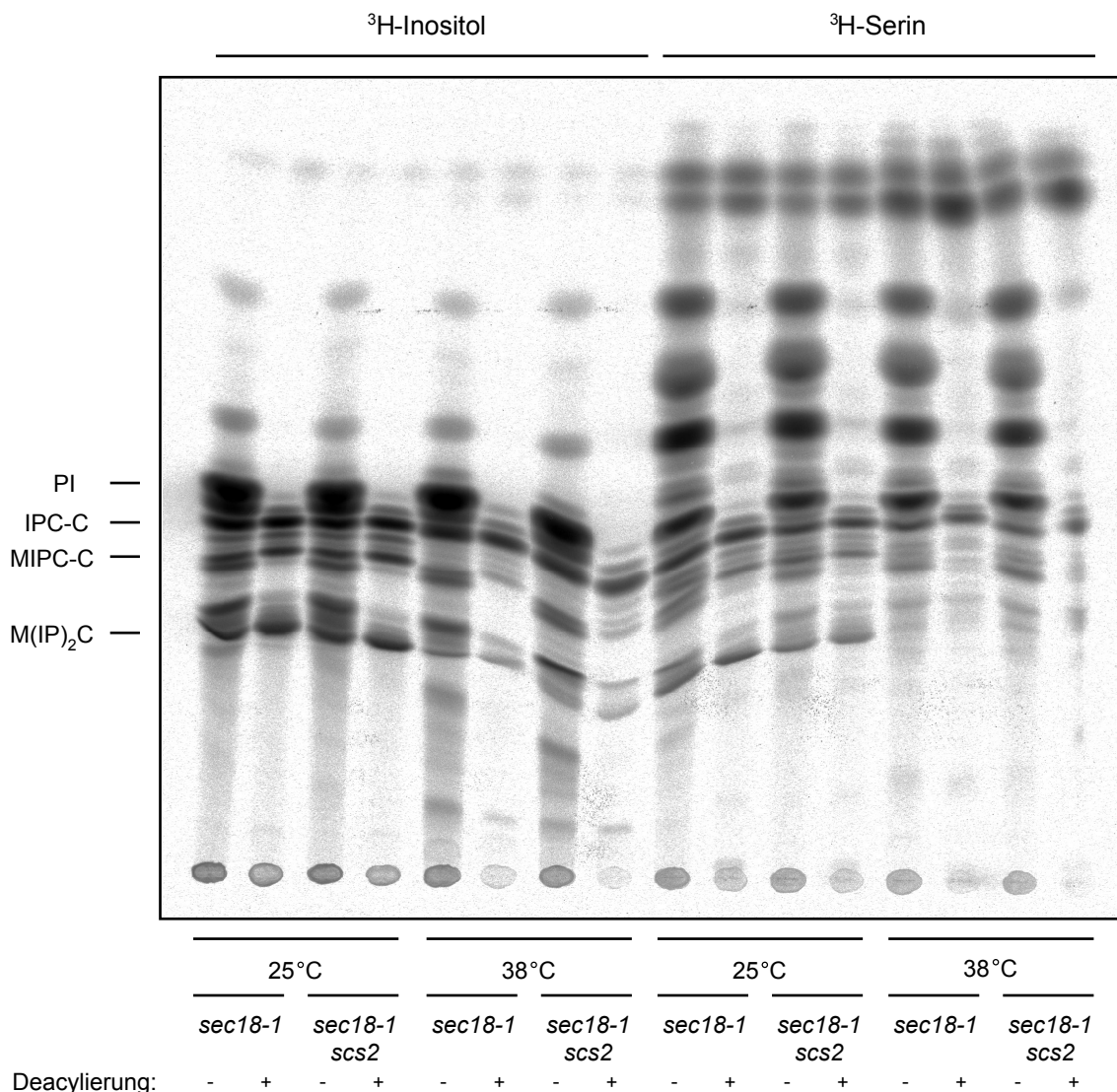


Abb. 24 Synthese von Sphingolipiden in *sec18-1* bzw. *sec18-1 scs2* Zellen unter permissiven (25°C) und nicht-permissiven Bedingungen (38°C).

3.8.4 Der Einbau von Ceramid in GPI-geankerte Proteine ist in *scs2* Zellen nicht beeinträchtigt

Studien zum Transport von Ceramid zur anderen Membranhälfte haben gezeigt, daß auch dieser sogenannte „Flip-flop“ ohne eine Katalyse durch Flippasen oder einen aktiven Transport nur sehr langsam erfolgt (Kolesnick et al., 2000). Daher könnte auch eine Beeinträchtigung eines derartigen Transportes zu einer verringerten IPC Synthese führen. Eine direkte Analyse dieses Prozesses war allerdings nicht möglich. Da der Austausch der

Diacylglycerol-Gruppe des Lipidanteils von GPI-geankerten Proteinen gegen Ceramid, der im ER wie auch im Golgi Apparat erfolgt, ebenfalls Ceramid an der lumenalen Membranseite benötigt, wurde dieses sogenannte „Remodelling“ analysiert. Ein weiterer Grund für dieses Experiment war, daß ein vermindertes „Remodelling“ im ER auch die Tunicamycin-Sensitivität von *scs2* Mutanten erklären könnte.

Für diese Untersuchung wurden wt und *scs2* Zellen mit ^3H -Inositol markiert und nach vollständiger Delipidierung aus den verbliebenen Zellpellets durch proteolytischen Verdau sogenannte Ankerpeptide präpariert. Diese wurden mit HNO_2 behandelt und die Produkte über DC getrennt. Bei dieser Spaltung reagiert N_2O_5 , das in sauren Lösungen von HNO_2 in Gegenwart von organischen Säuren gebildet wird, mit der Aminogruppe des Glucosamins der GPI-Anker unter Bildung eines Diazonium-Kations. Dessen spontaner Zerfall unter Freisetzung von N_2 und die nachfolgende Umlagerung des entstandenen Carbenium-Ions führt zur Bildung eines Anhydrozuckers und zur Öffnung der glykosidischen Bindung zum benachbarten Inositolring. Dabei entstehen drei mit ^3H markierte Produkte: GP (PI mit einer C_{26} Fettsäure), CP1 (IPC-C) und CP2 (IPC-B). Lipidanker, die GP oder CP1 enthalten, stammen aus dem „Remodelling“ der GPI-Anker im ER, während das Spaltprodukt CP2 nach einem „Remodelling“ in einem späteren Kompartiment (Golgi Apparat oder Plasmamembran) zu beobachten ist (Sipos et al., 1997). Eine Kontrollreaktion (Zugabe von NaCl statt NaNO_2) zeigte, daß die so entstandenen Produkte in der Tat aus GPI-Ankern stammten und keine Verunreinigungen mit Lipiden darstellten.

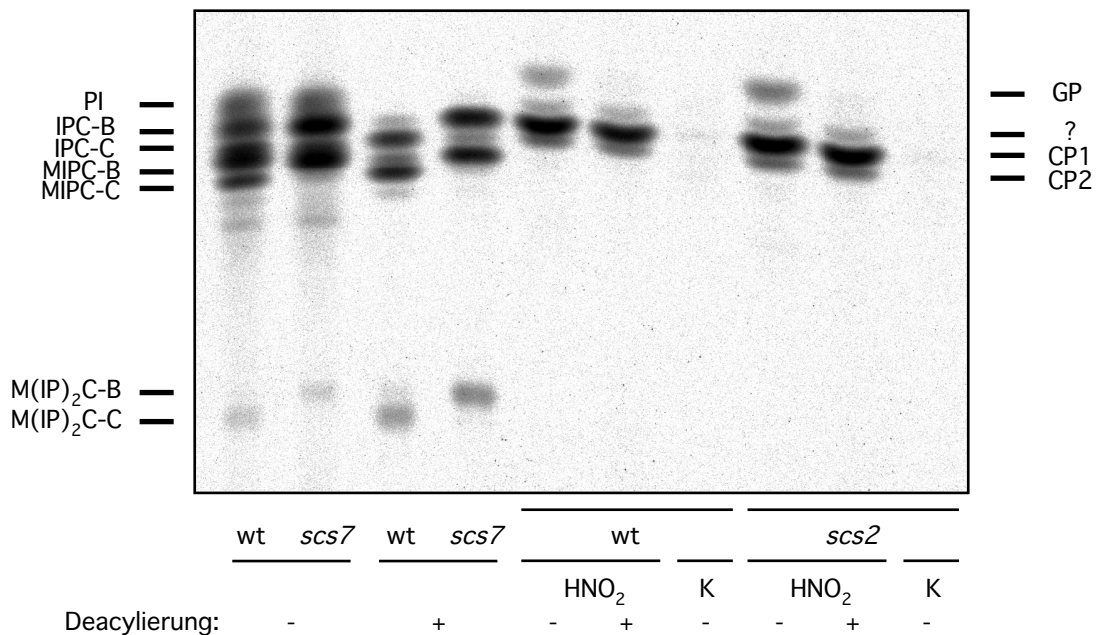


Abb. 25 Analyse der mit ^3H -Inositol markierten Spaltprodukte von GPI-Ankern aus wt und *scs2* Zellen. Zum Vergleich dienen Lipide aus wt und *scs7* Zellen.

Diese Versuche ergaben, daß in wt und *scs2* Hefen ein vergleichbarer Einbau von ^3H -Inositol in die Proteinfraction erfolgte und daß auch die Anteile der Ceramid enthaltenden GPI-Anker nicht signifikant verändert waren (Abb. 25). Dies spräche gegen eine verringerte Verfügbarkeit von Ceramid an der lumenalen Seite von ER und Golgi Apparat in *scs2* Mutanten. Allerdings ist es auch denkbar, daß der Austausch des Diacylglycerol-Anteils der GPI-Anker auch bei stark verminderter Verfügbarkeit von Ceramid mit normaler Rate erfolgt.

4 Diskussion

4.1 Einfluß einer Deletion von *SCS2* auf ER-Degradation, „Unfolded Protein Response“ und den vesikulären Transport durch den sekretorischen Weg

Zu Beginn dieser Arbeit wurde Scs2p als ein potentieller Bindungspartner von Cue1p, einer Komponente der ER-assoziierten Proteindegradation, identifiziert. Ein Fehlen von Scs2p hatte aber keinen Einfluß auf die Stabilität von Modellsubstraten, die über die bisher charakterisierten Cue1p-abhängigen Abbauwege am ER degradiert werden.

Da ER-Degradation und „unfolded protein response“ bei dem Aufrechterhalten der Funktionsfähigkeit des Endoplasmatischen Retikulums zusammenwirken (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000) und die in der Literatur erwähnte Tunicamycin-Sensitivität von *scs2* Stämmen auf eine geringere Toleranz des ER gegenüber Streßbedingungen hindeutete, wurde untersucht, ob die UPR in *scs2* Zellen beeinträchtigt ist. *scs2* Deletionsmutanten blieben jedoch wie Wildtyp Hefen bei einer kurzzeitigen Inkubation mit einer hohen Dosis an Tunicamycin lebensfähig, während Stämme mit fehlender UPR (*hac1*) gegenüber einer solchen Behandlung hypersensitiv waren. Die Translation des aktivierten Transkriptionsfaktors (Hac1-i)p nach einer Induktion der UPR und damit die Prozessierung der *HAC1* mRNA durch Ire1p erfolgten in *scs2* Mutanten wie in Wildtypzellen. Diese Experimente zeigen, daß *scs2* Mutanten die UPR und die Synthese von Chaperonen im Endoplasmatischen Retikulum als Antwort auf die Akkumulation falsch gefalteter Proteine in normaler Weise induzieren können. Die erhöhte Sensitivität dieser Hefen gegenüber einer Verringerung der N-Glykosylierung von Proteinen durch Tunicamycin hängt daher vermutlich nicht mit einer Beeinträchtigung der Funktionalität des Endoplasmatischen Retikulums zusammen, sondern mit den negativen Auswirkungen einer gestörten Glykosylierung auf die Zellwandstruktur.

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Funktion von Scs2p stammte von Untersuchungen der mutmaßlichen Orthologen von Scs2p in tierischen Zellen, die auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteine am vesikulären Transport hindeuten (Nishimura et al., 1999; Skehel et al., 1995). In *scs2* Zellen ließ sich aber, wie bereits von (Kagiwada et al., 1998) in Bezug auf Suc2p gezeigt, bei einem Test zweier weiterer sekretorischer bzw. vakuolärer Proteine keine Veränderung des Transports durch den sekretorischen Weg nachweisen. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde könnte sein, daß die in diesen mutmaßlichen Orthologen beschriebene „coiled-coil“ Sequenz in Scs2p nicht vorhanden ist.

Daher wurde begonnen, den Einfluß von Scs2p auf den Lipidstoffwechsel näher zu untersuchen, um auf diesem Wege möglicherweise Hinweise auf eine Funktion der ER-Degradation bei der Regulation zellulärer Prozesse zu erhalten. Abgesehen von der Degradation falsch gefalteter bzw. assemblierter Proteine und dem Abbau einzelner konstitutiv kurzlebiger Proteine im Cytosol, wurde bisher in *Saccharomyces cerevisiae* erst ein Prozeß eines durch Signale regulierten Abbaus unter Beteiligung von Cue1p/Ubc7p beschrieben. Die Stabilität von Hmg2p, eines Isoenzym der HMG-CoA Reduktase, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Isoprenstoffwechsels katalysiert, wird durch Intermediate dieses Stoffwechselweges reguliert (Hampton, 1998).

4.2 Die Regulation des Glycerolipid Stoffwechsels

Bei der ersten Beschreibung von SCS2 wurde gezeigt, daß eine Deletion dieses Gens zu einer verminderten Expression von *INO1* führt, während eine Überexpression von Scs2p die Inositol-Auxotrophie verschiedener Mutanten aufhebt (Nikawa et al., 1995). Unter den supprimierten Gendefekten befand sich auch ein mutiertes Allel von *HAC1*. Um den Einfluß von Scs2p auf die Regulation der Biosynthese von Glycerophospholipiden weitergehend zu untersuchen, analysierten wir auch die mRNA von *OPI3*, eines Vertreters einer großen Gruppe von koordiniert über die Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p regulierten Genen. Dabei zeigte sich, daß die Expression von *OPI3* in *scs2* Mutanten unabhängig von der Zugabe von Inositol zum Kulturmedium sowohl unter reprimierenden als auch dereprimierenden Bedingungen gegenüber dem Wildtyp vermindert war. Da auch die mRNA Menge des autoregulatorisch exprimierten Transkriptionsfaktors Ino2p in *scs2* Zellen verringert war, weisen diese Mutanten wahrscheinlich eine generell verringerte Ino2p/Ino4p-abhängige Genexpression auf. Für einen spezifischen Einfluß auf entweder die Inositol oder die Cholin-Repression ergaben sich keine Hinweise, auch nicht für eine von besagter Transkriptionsregulation unabhängige Wirkung auf die enzymatischen Aktivitäten von Enzymen der Glycerolipid Biosynthese. Der Einbau von dem Medium zugesetzten Vorstufen des Lipidstoffwechsels (Inositol, Cholin) in die Lipidfraktion war in *scs2* Mutanten ebenfalls nicht beeinträchtigt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde entdeckt, daß auch die Deletion zweier weiterer Gene zu einer generell verminderten Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkription führt. Dies waren *UBC7*, das für eine Komponente der ER-Degradation kodiert (Biederer et al., 1996) und *LCB3*, dessen Genprodukt für den überwiegenden Teil der in *S. cerevisiae* vorhandenen Sphingosin-P Phosphatase Aktivität verantwortlich ist (Mao et al., 1999). Kombinationen von Deletionen aller drei genannten Gene verhielten sich in Hinblick auf die Expression von *INO1* und *OPI3* additiv, so daß keine epistatische Beziehung zwischen ihnen besteht. Obgleich

eine Reihe von Möglichkeiten für einen funktionellen Zusammenhang zwischen den drei Genen in Hinblick auf diese Transkriptionsregulation in Betracht gezogen wurden, deutet doch alles auf eine unabhängige Wirkungsweise hin. Die Ino2p/Ino4p-abhängige Regulation integriert eine Vielzahl von Signalen zu einer einheitlichen Steuerung der Synthese von Glycerophospholipiden, so daß ein solcher Befund nicht erstaunlich ist.

In Hinblick auf *ubc7* (und *cue1*) erscheint es wahrscheinlich, daß ein cytosolisches Protein, welches als negativer Regulator der über Snf1p/Snf4p vermittelten Inositol-Derepression fungiert, ein natürliches Substrat der ER-Degradation ist. Dafür spricht, daß eine *hrd3* Deletion im Gegensatz zu *ubc7* keinen Einfluß auf die Inositol-Abhängigkeit eines *hac1* Stammes hatte und somit ein Hrd3p-unabhängiger Abbauweg die *INO1* Expression beeinflusst (nicht publizierte Daten). Nach bisherigem Kenntnisstand werden cytosolische Proteine und sogenannte C-terminal verankerte Proteine ohne Beteiligung von Hrd3p degradiert. Zudem verringerte sich in *ubc7* Mutanten nicht nur die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels nach Inositol-Derepression sondern auch die Expression von Invertase nach Glucose-Derepression (nicht publizierte Daten). Beide Signale werden von einem Snf1p/Snf4p-Kinasekomplex vermittelt. Eine mögliche Erklärung wäre daher, daß Reg1p in *ubc7* Zellen stabilisiert ist. Reg1p ist ein instabiles Protein, welches als regulatorische Untereinheit der Phosphatase1 (Glc7p) diese an Snf1p/Snf4p-Komplexe bindet und so bewirkt, daß deren Kinaseaktivität attenuiert wird (Ouyang et al., 1999; Sanz et al., 2000; Shirra und Arndt, 1999).

Die Induktion der UPR in Inositol-freiem Medium wurde durch Deletionen von *SCS2*, *UBC7* oder *LCB3* nicht beeinträchtigt, sondern es erfolgte entsprechend der verminderten Synthese von PI eine verstärkte Prozessierung der *HAC1* mRNA. Eine zusätzliche Deletion von *HAC1* steigerte die Inositol-Abhängigkeit der verschiedenen Mutanten und verringerte die *INO1* Expression. Die durch eine stärkere Aktivierung der UPR erhöhte Inositol Synthese gleicht demnach den Inositol-Mangel der *scs2*, *ubc7* und *lcb3* Stämme zum Teil aus. Die Expression einer zusätzlichen Kopie von *SCS2* von einem „single-copy“ Vektor verringerte die Inositol-Abhängigkeit von *hac1* und *hac1 lcb3* Mutanten und führte zu einer verstärkten *INO1* Expression. Die Tatsache, daß Scs2p ursprünglich als ein Suppressor der Inositol-Auxotrophie eines Stammes mit einem mutierten Allel von *HAC1* identifiziert wurde, läßt sich daher mit den Auswirkungen einer erhöhten Proteinmenge von Scs2p auf die *INO1* Expression erklären und beruht nicht auf einem Einfluß dieses Proteins auf die UPR. Daß eine starke Überexpression von *SCS2* in unserem genetischen Hintergrund nicht zu einer Suppression der Inositol-Abhängigkeit von *hac1* Hefen führte, beruht vermutlich auf Unterschieden zwischen den verwendeten Stämmen von *S. cerevisiae*.

4.3 Der Einfluß von Scs2p auf den Sphingolipid Stoffwechsel

Neben der verringerten Expression von Genen der Glycerolipid-Synthese zeigten *scs2* Stämme eine erhöhte Sensitivität gegen Aureobasidin A, einen Inhibitor der IPC Synthase. Messungen des Anteils komplexer Sphingolipide an den gesamten Phospholipiden der Zelle zeigten, daß dieser Phänotyp auf einer stärkeren Verringerung des Sphingolipidgehaltes der Zelle durch AbA beruhte, statt auf einer höheren Empfindlichkeit der Zelle gegenüber einer Reduktion des Sphingolipidanteils. *scs2* Zellen waren auch in Inositol-reichem Medium, in dem sie einen hohen Gehalt von PI aufwiesen, der gegenüber dem von Wildtyp Zellen nicht vermindert war, empfindlich gegen AbA. Die geringere Synthese von IPC ist unter diesen Bedingungen keine Folge einer eingeschränkten Verfügbarkeit von PI.

Deletionen von *HAC1* und *UBC7* verursachten keine erhöhte AbA-Sensitivität und verstärkten auch in Kombination mit *scs2* dessen Phänotyp nicht, so daß die Sensitivität gegen AbA keine Folge einer verminderten Induktion der Ino2p/Ino4p-abhängigen Transkription ist. Zudem ließ sich die höhere Toxizität von AbA auf *scs2* Mutanten auch in Stämmen beobachten, in denen die Gene der Transkriptionsfaktoren Ino2p oder Ino4p deletiert wurden.

scs2 Mutanten erwiesen sich auch als sensitiv gegenüber Inhibitoren früherer Schritte der Sphingolipid Synthese (Myriocin, Australifungin, Fumonisin B₂) sowie gegen die Zugabe von Phytosphingosin zum Medium (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Vielfältigkeit dieser Einflüsse auf den Sphingolipid Stoffwechsel und unserer Beobachtungen mit anderen Inhibitoren ist es sehr unwahrscheinlich, daß eine verstärkte Aufnahme dieser Substanzen aus dem Medium für die beobachteten Effekte verantwortlich ist.

Im folgenden wurde untersucht, welcher Schritt der Sphingolipid Biosynthese durch eine Deletion von *SCS2* beeinträchtigt wird und ob Scs2p selbst an einer enzymatischen Reaktion mitwirkt oder die Regulation dieses Stoffwechselweges verändert. Für eine Reihe von Syntheseschritten wurden in *S. cerevisiae* die beteiligten Genprodukte bisher noch nicht oder nur zum Teil beschrieben. Dies gilt z.B. für die Synthesen von C₂₆- Fettsäuren, Ceramid und IPC sowie den Transport von Ceramid vom ER zum Ort der IPC Synthese im Golgi Apparat, wobei zumindest die drei erstgenannten enzymatischen Reaktionen für die Lebensfähigkeit der Hefen essentiell sind. Die Deletion einer genomischen Sequenz (*Ybl091c-a*), deren translatierte Aminosäurefolge eine Sequenzhomologie zu Scs2p aufweist, hatte keinen Einfluß auf das Zellwachstum und die Inositol-Abhängigkeit oder AbA-Sensitivität von wt und *scs2* Zellen. Daher scheidet die Möglichkeit aus, daß Scs2p und Ybl091c-a gemeinsam eine essentielle Funktion ausüben.

Änderungen des Sphingosin-Phosphat Stoffwechsels wurden in *scs2* Zellen nicht beobachtet und können nicht für die AbA-Sensitivität dieser Zellen verantwortlich sein, da

eine Deletion der Sphingosin Kinase Lcb4p, die zu einer Verringerung der Sphingosin-P Synthese um 95% führt, die Toxizität von AbA auf wt und *scs2* Zellen nicht veränderte.

Ein Fehlen der Sphingosin-P Phosphatase Lcb3p verstärkte die Toxizität von Aureobasidin A auf *scs2* Mutanten, während *lcb3* Einzelmутanten nur eine geringe AbA-Sensitivität aufwiesen. Im Gegensatz dazu erwiesen sich *lcb3* Mutanten als weitaus empfindlicher gegen Inhibitoren früherer Schritte der Sphingolipid Biosynthese als *scs2* Hefen. Analysen der Lipidzusammensetzung zeigten, daß der Ceramid Gehalt der Zellen in *lcb3*, nicht aber in *scs2* Mutanten reduziert ist. Daher beeinträchtigt die Deletion von SCS2 einen Schritt der Sphingolipid Biosynthese, der nach der Synthese von Ceramid (und deren Vorstufen Sphingosin und C₂₆-CoA) erfolgt. Das Spektrum der verschiedenen, unterschiedlich stark hydroxylierten Sphingolipide blieb in *scs2* Zellen unverändert, so daß Scs2p die Aktivitäten der Sphingonin und Ceramid Hydroxylasen Sur2p bzw. Scs7p nicht beeinflusste.

Mögliche weitere Erklärungen des Einflusses einer *scs2* Deletion auf den Sphingolipid Stoffwechsel wären ein verminderter Transport von Ceramid vom ER zum Syntheseort der komplexen Sphingolipide im Golgi Apparat oder ein geringerer „Flip-Flop“ dieser Vorstufe zur lumenalen Seite der Membran. Versuche zur Synthese von Sphingolipiden in *sec18-1* Mutanten unter nicht-permissiven Bedingungen und zum Einbau von Ceramid in GPI-geankerte Proteine gaben jedoch keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein solcher Defekte in *scs2* Zellen.

Die Sensitivität von *scs2* Mutanten gegen Aureobasidin A beruht daher höchstwahrscheinlich auf einer niedrigeren IPC Synthase Aktivität und nicht auf einer geringeren Verfügbarkeit der Substrate PI und Ceramid für die IPC Synthese. Der Anteil von komplexen Sphingolipiden an den gesamten Phospholipiden war in *lcb3* Stämmen gegenüber dem wt immer leicht vermindert, in *scs2* Stämmen jedoch nur in Inositol-freiem Medium oder in Gegenwart einer intermediären Konzentration an AbA, d.h. unter Bedingungen, unter denen die Konzentrationen der Substrate (PI, Ceramid) oder die Enzymaktivität der IPC Synthase (AbA) verringert sind. Daher beruht die AbA-Sensitivität von *scs2* Stämmen auf einer verringerten Fähigkeit dieser Mutanten, die Umsatzrate der IPC Synthase unter diesen Bedingungen zu erhöhen. Somit ist die wahrscheinlichste Erklärung des Einflusses von Scs2p auf den Sphingolipid Stoffwechsel, daß ein Fehlen dieses Proteins die Regulation der IPC Synthase beeinträchtigt.

Da Scs2p im ER lokalisiert ist (Kagiwada et al., 1998), während die IPC Synthese im Golgi Apparat stattfindet (Levine et al., 2000), stellt sich die Frage, wie eine solche Fernwirkung zu erklären ist. Angesichts der gleichartigen Verteilung von Sphingolipiden und Steroiden in den Membranen verschiedener Kompartimente (Hechtberger et al., 1994; Tuller et al., 1999) und der Tatsache, daß beide Substanzgruppen in Hefe über einen größeren hydrophoben Anteil verfügen als Glycerophospholipide, könnte die Konzentration der

Sphingolipide in ähnlicher Weise reguliert werden, wie das für die Regulation des Steroidgehaltes tierischer Zellen postuliert wurde. Dabei wurde angenommen, daß die Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum gemessen wird, d.h. an der niedrigsten Stelle des Konzentrationsgradienten entlang des sekretorischen Weges. Die Entdeckung der vermutlich im ER lokalisierten Sphingolipid Phospholipase C Isc1p bot daher die Möglichkeit zu testen, ob die Konzentration von komplexen Sphingolipiden im ER eine Rolle bei der Regulation der Sphingolipid Synthese spielt. Experimente mit *isc1* Deletionsstämmen bzw. *ISC1* überexprimierenden Zellen gaben jedoch keine Anhaltspunkte für einen solchen Mechanismus.

Eine weitere Möglichkeit einer Regulation der IPC Synthese vom ER aus besteht darin, daß die Konzentration von Zwischenprodukten der Sphingolipid Synthese wie Sphingosin oder Ceramid im ER die Synthese von komplexen Sphingolipiden beeinflusst. Da jedoch das Fehlen verschiedener Enzyme, welche die Konzentration und Zusammensetzung dieser Metabolite beeinflussen (Sur2p, Scs7p, Lcb3p, Lcb4p, Dpl1p Ypc1p/Ydc1p), verglichen mit einer Deletion von *SCS2*, jeweils nur eine geringe oder gar keine AbA-Sensitivität verursachte, dürfte Scs2p keine derartige Regulation vermitteln.

4.4 Der Einfluß des Sphingolipid Stoffwechsels auf die Regulation der Glycerolipid Synthese

Über welche Veränderungen des Sphingolipid Stoffwechsels eine Deletion von *LCB3* zu einer verminderten *INO1* Expression führt, konnte noch nicht hinreichend geklärt werden. Vermutlich ist nicht die Akkumulation von Sphingosin-P ausschlaggebend, da ein Fehlen der Sphingosin-P Lyase Dpl1p, welches gleichfalls zu einer erhöhten Sphingosin-P Konzentration führt (Kim et al., 2000), die Inositol-Abhängigkeit von *scs2* Zellen nicht verstärkte. Auch eine externe Zugabe von Phytosphingosin, die zu einer verstärkten Lyse von Sphingosin-P durch Dpl1p und damit einer verstärkten Bildung von Abbauprodukten führt, hatte kaum Auswirkungen auf die Expression von *INO1*. Somit kämen die verringerten Konzentrationen von Sphingosin, Ceramid und komplexen Sphingolipiden als Ursachen der in *lcb3* Mutanten zu beobachtenden niedrigeren Transkription von *INO1* und *OPI3* in Betracht.

Wenn *S.cerevisiae* in Inositol-freiem Kulturmedium wächst, dient etwa 60% des von der Zelle synthetisierten PI als Ausgangsprodukt für die Synthese von komplexen Sphingolipiden. Daher ist es denkbar, daß ein niedriger Sphingolipidgehalt direkt eine Erhöhung der *INO1* Expression und damit der PI Synthese induziert. Eine Reduktion der Synthese von Sphingolipiden durch einen der drei Inhibitoren Myriocin, Australifungin oder AbA verursachte jedoch nicht den erwarteten Anstieg der *INO1* mRNA Menge, sondern stattdessen verringerte sich die *INO1* Expression gegenüber dem Niveau in unbehandelten Zellen. Daher scheint eine niedrigere IPC Synthese die Ino2p/Ino4p-abhängige Genexpression nicht direkt

zu aktivieren, sondern nur indirekt durch die Menge des für die Sphingolipid Synthese konsumierten PI zu beeinflussen. Die der Inositol-Repression zugrundeliegenden Sensoren würden demnach den verbleibenden PI Gehalt der Membranen messen und die Inositol Synthese entsprechend regulieren.

Insofern könnten Mutationen, die zu einer geringeren Sphingolipid Synthese führen, als Nebeneffekt in Inositol-freiem Medium eine geringere *INO1* Expression verursachen. Dieses sollte aber die *OPI3* Expression in Inositol-reichem Medium nicht beeinflussen, da dann nur ein wesentlich geringerer Teil des neu synthetisierten PI für die IPC Synthese verwendet wird. Zudem ließe sich ein solcher Effekt nur beobachten, wenn der PI Gehalt nicht so niedrig ist, daß er eine maximale Inositol-Derepression verursacht. Da *lcb3* Mutanten auch in Inositol-reichem Medium eine verringerte *OPI3* Expression aufwiesen und die Deletion von *LCB3* selbst in *scs2 hac1* Mutanten zu einer weiteren Verringerung der schon sehr niedrigen *INO1* Expression führte, läßt sich der Einfluß von *lcb3* auf den Ino2p/Ino4p-abhängige Transkription nicht durch eine verringerte IPC Synthese erklären.

Änderungen der chemischen Zusammensetzung der zellulären Sphingosine (*sur2*) und Ceramide (*sur2*, *scs7*) führten nicht zu dramatischen Änderungen der *INO1* Synthese. Allerdings deuten die bisherigen Daten auf eine Funktion von Sphingosin bei der Regulation der Inositol Synthese hin. So reduzierte sich die *INO1* Expression in einem Ceramidase-defizienten Stamm, der einen erhöhten Gehalt an Ceramid aufwies und in dem auch der Anteil der komplexen Sphingolipide an den gesamten Phospholipiden erhöht war (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Ceramid Menge führt wahrscheinlich durch eine Inhibition der Sphingosin-P Phosphatase Aktivität zu einer geringeren Sphingosin Konzentration. Im Gegensatz dazu war in *sur2* und *sur2 scs7* Mutanten eine leichte Erhöhung der *INO1* Expression zu beobachten. In diesen Stämmen war der Ceramid Gehalt gegenüber dem Wildtyp verringert, während die zu beobachtende Akkumulation von Sphingosin-P auf eine erhöhte Sphingosin Konzentration hindeutete. Möglicherweise ist das in *sur2* Mutanten ausschließlich vorhandene Sphinganin ein schlechteres Substrat für die Ceramid Synthese als Phytosphingosin. In *lcb3* Mutanten schließlich ist die Konzentration von Sphingosin, Ceramid und komplexen Sphingolipiden verringert und die *INO1* Expression reduziert. Daher korrelieren die Veränderungen der Inositol Expression mit der veränderten Sphingosin Konzentration der Zelle.

Allerdings waren die beobachteten Effekte von *sur2*, *scs7* und *ypc1 ydc1* in einem *scs2* Hintergrund nicht zu beobachten. Daraus könnte man schließen, daß Scs2p eine Sphingosin-abhängige Aktivierung der *INO1* Expression vermittelt. Dann dürfte jedoch auch eine Deletion von *LCB3* die *INO1* Expression in *scs2* Stämmen nicht weiter verringern, was nicht der Fall ist. Eine alternative Erklärung wäre, daß in *scs2* Mutanten, die in Inositol-freiem Medium kultiviert werden, durch den verminderten Gehalt an komplexen Sphingolipiden die

Sphingosin Konzentration soweit erhöht wird, daß die Effekte von *sur2* und *ypc1 ydc1* nicht mehr beobachtet werden können. In *lcb3* Zellen wäre ein solcher Regulationsmechanismus vermutlich bereits aktiviert, da diese Hefen gegenüber Myriocin und Australifungin hypersensitiv sind, oder er wäre nicht vorhanden, wenn er auf einer Aktivierung von Lcb3p beruhen würde. Eine zusätzliche Deletion von *SCS2* könnte dann die Wirkung von *lcb3* auf den Sphingosin Gehalt nicht mehr aufheben.

4.5 Zur Funktion von Scs2p

Die vorhandenen Daten weisen darauf hin, daß in *scs2* Zellen eine Regulation der IPC Synthase Aktivität beeinträchtigt ist, deren Mechanismus mitsamt den daran beteiligten Komponenten bisher unbekannt ist. Daher könnten *scs2* Stämme helfen, andere an dieser Regulation beteiligte Proteine mit genetischen Mitteln zu identifizieren. Zudem schafft die Kombination von *scs2* mit anderen Mutationen im Sphingolipid Stoffwechsel neue Möglichkeiten, diesen Syntheseweg experimentell zu beeinflussen, wodurch zum Beispiel das Auffinden noch unbekannter Komponenten erleichtert werden könnte.

Experimente mit einem verkürzten Scs2(Δ T)p zeigten, daß der C-terminale Membrananker für die Funktionalität von Scs2p erforderlich ist. Ob jedoch nur eine Verankerung von Scs2p in der ER-Membran erforderlich ist oder diese hydrophobe Sequenz auch an anderen Funktionen wie etwa der Interaktion zwischen Proteinen beteiligt ist, muß noch analysiert werden. Dafür könnte man z.B. die C-terminale Sequenz durch die Transmembranhelix eines anderen C-terminal verankerten ER-Proteins ersetzen. Ein Vergleich des in Hefe exprimierten verkürzten Proteins mit einer in *E. coli* synthetisierten Variante ergab, daß das abweichende Laufverhalten von Scs2p im SDS-PAGE nicht durch eine kovalente Modifikation verursacht wird. Möglicherweise beeinflussen der sehr saure Charakter von Scs2p (pI 4,67) oder das Vorhandensein stabiler Sekundärstrukturen die Laufeigenschaften von Scs2p in der Gelelektrophorese.

Der Einfluß von Scs2p auf den Sphingolipid Stoffwechsel ist unabhängig von den Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p, da die durch eine Deletion von *SCS2* verursachte AbA-Sensitivität auch in einem *ino2* oder *ino4* Stamm zu beobachten ist und ansonsten unter Bedingungen untersucht wurde, in denen die Ino2p/Ino4p-abhängige Transkription reprimiert ist. Andererseits läßt sich auch nach einem Wachstum in mit 75µM Inositol supplementiertem Medium in *scs2* Mutanten eine verminderte Expression von *OP13* feststellen, obgleich unter diesen Bedingungen der Sphingolipidgehalt dieser Hefen nicht reduziert ist. Daher sind die verringerte Ino2p/Ino4p-abhängige Expression von Genen des Glycerophospholipid Stoffwechsels und die verminderte Sphingolipid Synthese wechselseitig unabhängige Auswirkungen des *scs2* Phänotyps.

Ein Fehlen von Scs2p beeinflusst somit unabhängig voneinander zwei verschiedene Regulationssysteme des Lipidstoffwechsels, ohne daß die Analysen der Lipidzusammensetzung einen Hinweis auf eine direkte Beteiligung dieses Proteins an einem Syntheseschritt in einem dieser Stoffwechselwege ergeben hätten. In diesem Zusammenhang ist es auch von Interesse, daß sich in *scs2* Zellen Veränderungen zeigten, die sich nicht aus einer abweichenden Lipidzusammensetzung erklären ließen. Dies gilt zum einen für die Sensitivität gegen Tunicamycin, die auch in Inositol-reichem Medium zu beobachten ist, wenn weder der PI Gehalt der Membranen noch der Anteil der Sphingolipide reduziert sind. Zum anderen zeigten *scs2* Mutanten auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Farbstoff Calcofluor, der den Aufbau der Zellwand stört (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Hinweis auf mögliche vielfältige und unzusammenhängende Effekte von Scs2p ergibt sich aus dem Wachstumsphänotyp, der durch die Überexpression dieses Proteins von einem „multi-copy“ Plasmid verursacht wird. Diese führte nicht zu einer erkennbaren Veränderung der Lipidzusammensetzung und auch nicht zu einer veränderten Sensitivität gegen AbA. Die Hefen wiesen jedoch, verglichen mit wt oder *scs2* Zellen, eine erhöhte Sensitivität gegenüber Kaffein auf (Daten nicht gezeigt).

Daher ist es wahrscheinlich, daß die primäre Funktion von Scs2p nicht im Lipidstoffwechsel liegt, sondern daß dieses Protein an einer übergeordneten Funktion beteiligt ist, die verschiedene Prozesse in der Zelle beeinflusst. Eine Möglichkeit wäre, daß Scs2p eine strukturelle Funktion im Endoplasmatischen Retikulum erfüllt. Da jedoch eine leicht erhöhte Proteinmenge von Scs2p zu einer stärkeren Expression von *INO1* und *OPI3* führte, erscheint ein direkter Einfluß auf regulatorische Prozesse als wahrscheinlicher. Die Signalwege, die bei Inositol-Mangel den Snf1p/Snf4p-Komplex aktivieren, der dann die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Ino2p und Ino4p vermittelt, sind noch unbekannt. Zudem ist nicht geklärt, ob auch andere, von diesem Kinasekomplex unabhängige Mechanismen der Signaltransduktion an der Steuerung der beiden Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Eine mögliche Erklärung des komplexen Phänotyps von *scs2* Mutanten wäre, daß die Deletion von *SCS2* zu einer Erhöhung der im Cytosol verfügbaren Menge an Phosphatase1 führt, welche die Aktivität des Snf1p/Snf4p-Komplexes begrenzt (Shirra und Arndt, 1999).

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Cue1p und Scs2p konnte bisher nicht aufgezeigt werden. Die Einflüsse von Deletionen von *SCS2* oder *UBC7* auf die Ino2p/Ino4p-abhängige Transkriptionsregulation waren unabhängig vom Vorhandensein des jeweils anderen Proteins, und auch die AbA-Sensitivität von *scs2* Hefen oder der Phänotyp einer *SCS2* Überexpression wurden durch eine Deletion von *UBC7* nicht beeinflusst. Auf der anderen Seite hatte eine Deletion von *SCS2* keinen Effekt auf die verschiedenen Cue1p-abhängigen Degradationswege. Da die Kopplung von Cue1p an sich selbst oder Scs2p nahezu vollständig erfolgte, während andere Kopplungsprodukte nur in Spuren nachweisbar

waren, ist es wahrscheinlich, daß Scs2p einer der Hauptbindungspartner von Cue1p ist. Ob der Cue1p-Scs2p Komplex auch Ubc7p enthält, wurde noch nicht untersucht. Cue1p liegt bei Abwesenheit von Streßbedingungen, welche die UPR auslösen, gegenüber Ubc7p in einem leichten Überschuß vor, wobei Ubc7p vollständig an Cue1p gebunden ist. Nach einer Induktion der UPR werden sowohl Cue1p als auch Ubc7p verstärkt exprimiert, die Menge der *UBC7* mRNA erhöht sich aber deutlich stärker als die Transkriptmenge von *CUE1* (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000).

Scs2p ist ein relativ häufiges Protein, welches sich mit einer Vielzahl von anderen Proteinen quervernetzen läßt. Daher wäre es denkbar, daß Scs2p bestimmte nicht assemblierte Proteine bindet und deren Aggregation verhindert oder die Proteinmenge beeinflusst, die für eine Bildung von Komplexen verfügbar ist, d.h. als eine Art Puffer fungiert. Eine solche Hypothese stünde auch mit der Bindung der mutmaßlichen Orthologen von Scs2p in höheren Eukaryoten an SNARE-Proteine im Einklang. Daher wäre eine weitergehende Analyse der Auswirkungen einer Überexpression von Scs2p von Interesse.

4.6 Überlegungen zur Untersuchung einer möglichen Steuerung des Glycerolipid Stoffwechsels durch Sphingosin

Die bisherigen Daten erlauben es nicht, schlüssig zu beweisen, ob Sphingosin die Synthese von Glycerolipiden reguliert. Sie schaffen aber die Basis für das Formulieren einer experimentellen Strategie, die der Komplexität dieses regulatorischen Systems besser Rechnung trägt.

Wenn der Einfluß von Mutationen im Sphingolipid Syntheseweg auf die Transkriptionsregulation der Glycerolipid Synthese in Inositol-freiem Medium untersucht wird und man davon ausgeht, daß die Konzentration von Sphingosin, nicht aber von Ceramid oder komplexen Sphingolipiden die Ino2p/Ino4p-abhängige Transkriptionsregulation direkt beeinflusst, resultiert die *INO1* Expression dennoch aus der Addition verschiedener, z.T. gegenläufiger Einflüsse. Dies wären:

- die direkte Wirkung der Sphingosin Konzentration auf die Ino2p/Ino4p-abhängige Transkriptionsregulation,
- der Einfluß der IPC Syntheserate auf den PI Gehalt der Membran und die in Abhängigkeit davon regulierte Inositol-Repression,
- die verstärkte Induktion der UPR infolge eines in Mutanten verminderten PI Gehaltes bzw. einer verringerten Synthese von Sphingolipiden,
- der mögliche direkte Einfluß von Zwischenprodukten des Sphingolipid Stoffwechsels auf die Aktivität von Enzymen der Glycerolipid Synthese,

- eventuelle Wechselwirkungen zwischen einer durch eine erhöhte Konzentration von Sphingosin-P aktivierten „heat shock response“ und der UPR, z.B. über eine Induktion von BiP durch die „heat shock response“, wodurch die Aktivierung der UPR vermindert werden könnte,
- der Einfluß einer verstärkten Metabolisierung von Sphingosin-P zu PE über die Sphingosin-P Lyase und den „Kennedy-Pathway“ sowie
- Rückwirkungen des Glycerolipid Stoffwechsels auf die Regulation der Transkription oder der enzymatischen Aktivität von Enzymen der Sphingolipid Synthese, insbesondere der Einfluß des PI Gehaltes auf die IPC Synthese.

Erschwert wird jede Interpretation dadurch, daß die Mechanismen der Regulation des Sphingolipidstoffwechsels relativ komplex sind und bisher kaum erforscht wurden. Dabei reguliert die Zelle zumindest drei Schritte des Syntheseweges: die Ketosphinganin Synthese, die Ceramid Synthese und die IPC Synthese. Ob dies über unabhängige Regelkreise erfolgt oder z.B. ein niedriger Gehalt an komplexen Sphingolipiden neben der IPC Synthese auch direkt die Sphingosin Synthese stimuliert, ist nicht bekannt. Offenkundig ist die Vielfalt von Interaktionen in einem solchen regulatorischen Netz sehr hoch und erhöht sich noch, wenn man die Kompartimentierung einzelner Prozesse und die dadurch notwendigen Transportschritte sowie die indirekten Effekte, die aus der Signalfunktion einzelner Metabolite resultieren können, mit in Betracht zieht.

Durch die Wahl eines geeigneten experimentellen Systems kann man die Anzahl der zu berücksichtigen Faktoren jedoch reduzieren. Eine sehr interessante Strategie wäre, statt der *INO1* Expression in Inositol-freiem Medium die Expression von *OPI3* in Gegenwart von 75µM Inositol zu analysieren. Der unter diesen Bedingungen hohe PI Gehalt der Zelle (und damit die Inositol-Repression) wird dann durch die Rate der IPC Synthese nicht wesentlich beeinflusst und auch die Regulation der IPC Synthese Aktivität verliert durch die hohe Verfügbarkeit eines Substrates an Bedeutung. Zudem wird die UPR in Inositol-reichem Medium nicht induziert. Die Veränderungen der Syntheserate von anderen Glycerolipiden als PI, die durch eine verringerte Ino2/Ino4p-abhängige Transkription bewirkt werden, verursachen in den hier verwendeten Stämmen keinen Phänotyp und beeinflussen möglicherweise die Synthese von Sphingolipiden nicht. Der Einfluß des Sphingosin-P Stoffwechsels läßt sich durch eine Deletion von *LCB4* ausschalten. Veränderungen der Konzentrationen von Sphingosin bzw. Ceramid könnten dann außer in *sur2* oder *ypc1 ydc1* Stämmen z.B. durch die Verwendung eines Stammes, in dem eine Komponente der Ketosphinganin Synthese mutiert ist (*lcb1-100*), bzw. durch eine reduzierte Synthese von C₂₆-Fettsäuren in *elo3* Deletionsstämmen erzielt werden. Dabei ist eine direkte Messung des Sphingosin Gehaltes in diesen Stämmen erforderlich, da Interpretationen der Ergebnisse sonst zu sehr auf Hypothesen über die Mechanismen der Regulation der Sphingolipid Synthese beruhen.

Wenn *Saccharomyces cerevisiae* von einer normalen Wachstumstemperatur (25-30°C) auf 38°C erwärmt wird, erhöht sich der Sphingosin Gehalt der Zellen vorübergehend stark. Diese Reaktion ist ein Teil der zellulären „heat shock response“ und bewirkt einen zeitweiligen G0/G1-Arrest im Zellzyklus und eine erhöhte Expression von Tps1p, einer Untereinheit der Trehalose Synthase (Dickson et al., 1997a; Jenkins und Hannun, 2000; Jenkins et al., 1997). Ob dabei auch eine verstärkte Synthese von Enzymen der Glycerolipid Biosynthese induziert wird, wie das bei der „unfolded protein response“ der Fall ist, wurde noch nicht analysiert. Die physiologische Bedeutung einer Regulation der Ino2p/Ino4p-abhängigen Genexpression durch Sphingosin könnte aber darin bestehen, daß eine über die Sphingosin-Konzentration vermittelte Erhöhung des PI Gehaltes der Membranen und des Verhältnisses von Glycerolipiden zu Proteinen Teil einer Schutzreaktion der Zelle gegen Hitzestress oder andere Stressbedingungen ist.

5 Literaturverzeichnis

Ashburner, B. P. und Lopes, J. M.: Autoregulated expression of the yeast INO2 and INO4 helix-loop-helix activator genes effects cooperative regulation on their target genes. *Mol Cell Biol* **15** (1995), S. 1709-15

Ausubel, F. M.: *Current protocols in molecular biology*. New York: Verlag Greene Pub. Associates and Wiley- Interscience : J. Wiley (1988)

Bagnat, M.; Keranen, S.; Shevchenko, A. und Simons, K.: Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000), S. 3254-9

Beeler, T.; Bacikova, D.; Gable, K.; Hopkins, L.; Johnson, C.; Slife, H. und Dunn, T.: The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3- ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature- sensitive suppressors of the Ca²⁺-sensitive csg2Delta mutant. *J Biol Chem* **273** (1998), S. 30688-94

Beeler, T. J.; Fu, D.; Rivera, J.; Monaghan, E.; Gable, K. und Dunn, T. M.: SUR1 (CSG1/BCL21), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca²⁺ concentrations at 37 degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol Gen Genet* **255** (1997), S. 570-9

Biederer, T.; Volkwein, C. und Sommer, T.: Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **15** (1996), S. 2069-76

Biederer, T.; Volkwein, C. und Sommer, T.: Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278** (1997), S. 1806-9

Bonifacino, J. S. und Weissman, A. M.: Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14** (1998), S. 19-57

Chapman, R.; Sidrauski, C. und Walter, P.: Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14** (1998), S. 459-85

Chen, P.; Johnson, P.; Sommer, T.; Jentsch, S. und Hochstrasser, M.: Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell* **74** (1993), S. 357-69

Clarke, N. G. und Dawson, R. M.: Alkaline O leads to N-transacylation. A new method for the quantitative deacylation of phospholipids. *Biochem J* **195** (1981), S. 301-6

Coghlan, A. und Wolfe, K. H.: Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16** (2000), S. 1131-45

Coligan, J. E.: *Current protocols in protein science*. Brooklyn, N.Y.: Verlag Wiley (1995)

- Cox, J. S.; Chapman, R. E. und Walter, P.:** The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **8** (1997), S. 1805-14
- Cox, J. S.; Shamu, C. E. und Walter, P.:** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73** (1993), S. 1197-206
- Daum, G.; Lees, N. D.; Bard, M. und Dickson, R.:** Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14** (1998), S. 1471-510
- Dickson, R. C. und Lester, R. L.:** Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1438** (1999), S. 305-21
- Dickson, R. C.; Nagiec, E. E.; Skrzypek, M.; Tillman, P.; Wells, G. B. und Lester, R. L.:** Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J Biol Chem* **272** (1997a), S. 30196-200
- Dickson, R. C.; Nagiec, E. E.; Wells, G. B.; Nagiec, M. M. und Lester, R. L.:** Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. *J Biol Chem* **272** (1997b), S. 29620-5
- Dunn, T. M.; Haak, D.; Monaghan, E. und Beeler, T. J.:** Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b₅-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast* **14** (1998), S. 311-21
- Finger, A.; Knop, M. und Wolf, D. H.:** Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur J Biochem* **218** (1993), S. 565-74
- Friant, S.; Zanolari, B. und Riezman, H.:** Increased protein kinase or decreased PP2A activity bypasses sphingoid base requirement in endocytosis. *Embo J* **19** (2000), S. 2834-44
- Friedlander, R.; Jarosch, E.; Urban, J.; Volkwein, C. und Sommer, T.:** A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2** (2000), S. 379-84
- Gable, K.; Slife, H.; Bacikova, D.; Monaghan, E. und Dunn, T. M.:** Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J Biol Chem* **275** (2000), S. 7597-603
- Greenberg, M. L. und Lopes, J. M.:** Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **60** (1996), S. 1-20
- Griac, P. und Henry, S. A.:** The yeast inositol-sensitive upstream activating sequence, UASINO, responds to nitrogen availability. *Nucleic Acids Res* **27** (1999), S. 2043-50
- Haak, D.; Gable, K.; Beeler, T. und Dunn, T.:** Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* **272** (1997), S. 29704-10

- Hampton, R. Y.:** Genetic analysis of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase regulated degradation. *Curr Opin Lipidol* **9** (1998), S. 93-7
- Hannun, Y. A.:** Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274** (1996), S. 1855-9
- Hannun, Y. A. und Luberto, C.:** Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* **10** (2000), S. 73-80
- Hechtberger, P.; Zinser, E.; Saf, R.; Hummel, K.; Paltauf, F. und Daum, G.:** Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **225** (1994), S. 641-9
- Henry, S. A. und Patton-Vogt, J. L.:** Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61** (1998), S. 133-79
- Hill, K. und Cooper, A. A.:** Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system. *Embo J* **19** (2000), S. 550-61
- Jenkins, G. M. und Hannun, Y. A.:** Role for de novo sphingoid base biosynthesis in the heat induced transient cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **30** (2000), S. 30
- Jenkins, G. M.; Richards, A.; Wahl, T.; Mao, C.; Obeid, L. und Hannun, Y.:** Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272** (1997), S. 32566-72
- Kagiwada, S.; Hosaka, K.; Murata, M.; Nikawa, J. und Takatsuki, A.:** The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J Bacteriol* **180** (1998), S. 1700-8
- Kelley, M. J.; Bailis, A. M.; Henry, S. A. und Carman, G. M.:** Regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by inositol. Inositol is an inhibitor of phosphatidylserine synthase activity. *J Biol Chem* **263** (1988), S. 18078-85
- Kent, C. und Carman, G. M.:** Interactions among pathways for phosphatidylcholine metabolism, CTP synthesis and secretion through the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci* **24** (1999), S. 146-50
- Kim, S.; Fyrst, H. und Saba, J.:** Accumulation of phosphorylated sphingoid long chain bases results in cell growth inhibition in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156** (2000), S. 1519-29
- Kolesnick, R. N.; Goni, F. M. und Alonso, A.:** Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* **184** (2000), S. 285-300
- Leber, A.; Hrastnik, C. und Daum, G.:** Phospholipid-synthesizing enzymes in Golgi membranes of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **377** (1995), S. 271-4
- Lee, K. S.; Patton, J. L.; Fido, M.; Hines, L. K.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.; Henry, S. A. und Levin, D. E.:** The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *J Biol Chem* **269** (1994), S. 19725-30

- Lenk, U. und Sommer, T.:** Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *J Biol Chem* **275** (2000), S. 39403-10
- Levine, T. P.; Wiggins, C. A. und Munro, S.:** Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11** (2000), S. 2267-81
- Li, X.; Xie, Z. und Bankaitis, V. A.:** Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer proteins in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1486** (2000), S. 55-71
- Mandala, S. M. und Harris, G. H.:** Isolation and characterization of novel inhibitors of sphingolipid synthesis: australifungin, viridifungins, rustmicin, and khafrefungin. *Methods Enzymol* **311** (2000), S. 335-48
- Mandala, S. M.; Thornton, R. A.; Frommer, B. R.; Curotto, J. E.; Rozdilsky, W.; Kurtz, M. B.; Giacobbe, R. A.; Bills, G. F.; Cabello, M. A.; Martin, I. et al.:** The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N- acyltransferase from *Sporormiella australis*. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **48** (1995), S. 349-56
- Mao, C.; Saba, J. D. und Obeid, L. M.:** The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem J* **342 Pt 3** (1999), S. 667-75
- Mao, C.; Wadleigh, M.; Jenkins, G. M.; Hannun, Y. A. und Obeid, L. M.:** Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *J Biol Chem* **272** (1997), S. 28690-4
- Mao, C.; Xu, R.; Bielawska, A. und Obeid, L. M.:** Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *J Biol Chem* **275** (2000a), S. 6876-84
- Mao, C.; Xu, R.; Bielawska, A.; Szulc, Z. M. und Obeid, L. M.:** Cloning and Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* Alkaline Ceramidase with Specificity for Dihydroceramide. *J Biol Chem* **275** (2000b), S. 31369-31378
- Merkel, O.; Fido, M.; Mayr, J. A.; Pruger, H.; Raab, F.; Zandonella, G.; Kohlwein, S. D. und Paltauf, F.:** Characterization and function in vivo of two novel phospholipases B/lysophospholipases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274** (1999), S. 28121-7
- Mori, K.:** Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101** (2000), S. 451-4
- Morin-Ganet, M. N.; Rambourg, A.; Clermont, Y. und Kepes, F.:** Role of endoplasmic reticulum-derived vesicles in the formation of Golgi elements in sec23 and sec18 *Saccharomyces Cerevisiae* mutants. *Anat Rec* **251** (1998), S. 256-64
- Nagiec, M. M.; Baltisberger, J. A.; Wells, G. B.; Lester, R. L. und Dickson, R. C.:** The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994), S. 7899-902

- Nagiec, M. M.; Nagiec, E. E.; Baltisberger, J. A.; Wells, G. B.; Lester, R. L. und Dickson, R. C.:** Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *J Biol Chem* **272** (1997), S. 9809-17
- Nagiec, M. M.; Skrzypek, M.; Nagiec, E. E.; Lester, R. L. und Dickson, R. C.:** The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J Biol Chem* **273** (1998), S. 19437-42
- Nikawa, J.; Murakami, A.; Esumi, E. und Hosaka, K.:** Cloning and sequence of the SCS2 gene, which can suppress the defect of INO1 expression in an inositol auxotrophic mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)* **118** (1995), S. 39-45
- Nikawa, J.; Sugiyama, M.; Hayashi, K. und Nakashima, A.:** Suppression of the *Saccharomyces cerevisiae* hac1/ire15 mutation by yeast genes and human cDNAs. *Gene* **201** (1997), S. 5-10
- Nishimura, Y.; Hayashi, M.; Inada, H. und Tanaka, T.:** Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **254** (1999), S. 21-6
- Novick, P.; Field, C. und Schekman, R.:** Identification of 23 complementation groups required for post- translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21** (1980), S. 205-15
- Odorizzi, G.; Babst, M. und Emr, S. D.:** Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* **25** (2000), S. 229-35
- Okamura, K.; Kimata, Y.; Higashio, H.; Tsuru, A. und Kohno, K.:** Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **279** (2000), S. 445-50
- Ostrander, D. B.; O'Brien, D. J.; Gorman, J. A. und Carman, G. M.:** Effect of CTP synthetase regulation by CTP on phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273** (1998), S. 18992-9001
- Ouyang, Q.; Ruiz-Noriega, M. und Henry, S. A.:** The REG1 gene product is required for repression of INO1 and other inositol-sensitive upstream activating sequence-containing genes of yeast. *Genetics* **152** (1999), S. 89-100
- Plempner, R. K. und Wolf, D. H.:** Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep* **26** (1999), S. 125-30
- Puoti, A.; Desponds, C. und Conzelmann, A.:** Biosynthesis of mannosylinositolphosphoceramide in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on genes controlling the flow of secretory vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *J Cell Biol* **113** (1991), S. 515-25
- Qie, L.; Nagiec, M. M.; Baltisberger, J. A.; Lester, R. L. und Dickson, R. C.:** Identification of a *Saccharomyces* gene, LCB3, necessary for incorporation of exogenous long chain bases into sphingolipids. *J Biol Chem* **272** (1997), S. 16110-7

- Riezman, H.; Horvath, A.; Manning-Krieg, U. und Movva, R.:** Intracellular transport of GPI-anchored proteins by yeast. *Braz J Med Biol Res* **27** (1994), S. 323-6
- Robinson, K. A. und Lopes, J. M.:** The promoter of the yeast *INO4* regulatory gene: a model of the simplest yeast promoter. *J Bacteriol* **182** (2000), S. 2746-52
- Saba, J. D.; Nara, F.; Bielawska, A.; Garrett, S. und Hannun, Y. A.:** The *BST1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1- phosphate lyase. *J Biol Chem* **272** (1997), S. 26087-90
- Sanz, P.; Alms, G. R.; Haystead, T. A. und Carlson, M.:** Regulatory interactions between the *Reg1-Glc7* protein phosphatase and the *Snf1* protein kinase. *Mol Cell Biol* **20** (2000), S. 1321-8
- Sawai, H.; Okamoto, Y.; Luberto, C.; Mao, C.; Bielawska, A.; Domae, N. und Hannun, Y. A.:** Identification of *ISC1* (*YER019w*) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275** (2000), S. 39793-8
- Schneider, R.:** Brave little yeast, please guide us to thebes: sphingolipid function in *S. cerevisiae*. *Bioessays* **21** (1999), S. 1004-10
- Shamu, C. E.:** Splicing: HACKing into the unfolded-protein response. *Curr Biol* **8** (1998), S. R121-3
- Shirra, M. K. und Arndt, K. M.:** Evidence for the involvement of the *Glc7-Reg1* phosphatase and the *Snf1-Snf4* kinase in the regulation of *INO1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152** (1999), S. 73-87
- Shively, J. E. und Conrad, H. E.:** Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin. *Biochemistry* **15** (1976), S. 3932-42
- Sikorski, R. S. und Hieter, P.:** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122** (1989), S. 19-27
- Sipos, G.; Reggiori, F.; Vionnet, C. und Conzelmann, A.:** Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **16** (1997), S. 3494-505
- Skehel, P. A.; Martin, K. C.; Kandel, E. R. und Bartsch, D.:** A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* **269** (1995), S. 1580-3
- Skrzypek, M. S.; Nagiec, M. M.; Lester, R. L. und Dickson, R. C.:** Analysis of phosphorylated sphingolipid long-chain bases reveals potential roles in heat stress and growth control in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* **181** (1999), S. 1134-40
- Soussan, L.; Burakov, D.; Daniels, M. P.; Toister-Achituv, M.; Porat, A.; Yarden, Y. und Elazar, Z.:** *ERG30*, a VAP-33-related protein, functions in protein transport mediated by COPI vesicles. *J Cell Biol* **146** (1999), S. 301-11
- Sreenivas, A.; Patton-Vogt, J. L.; Bruno, V.; Griac, P. und Henry, S. A.:** A role for phospholipase D (*Pld1p*) in growth, secretion, and regulation of membrane lipid synthesis in yeast. *J Biol Chem* **273** (1998), S. 16635-8

- Sutterlin, C.; Doering, T. L.; Schimmoller, F.; Schroder, S. und Riezman, H.:** Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J Cell Sci* **110** (1997), S. 2703-14
- Tanida, I.; Takita, Y.; Hasegawa, A.; Ohya, Y. und Anraku, Y.:** Yeast Cls2p/Csg2p localized on the endoplasmic reticulum membrane regulates a non-exchangeable intracellular Ca²⁺ pool cooperatively with calcineurin. *FEBS Lett* **379** (1996), S. 38-42
- Travers, K. J.; Patil, C. K.; Wodicka, L.; Lockhart, D. J.; Weissman, J. S. und Walter, P.:** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101** (2000), S. 249-58
- Tuller, G.; Nemec, T.; Hrastnik, C. und Daum, G.:** Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* **15** (1999), S. 1555-64
- Van Den Hazel, H. B.; Kielland-Brandt, M. C. und Winther, J. R.:** Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* **12** (1996), S. 1-16
- van den hazel Miyake, Y.; Kozutsumi, Y.; Nakamura, S.; Fujita, T. und Kawasaki, T.:** Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun* **211** (1995), S. 396-403
- van der Rest, M. E.; Kamminga, A. H.; Nakano, A.; Anraku, Y.; Poolman, B. und Konings, W. N.:** The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **59** (1995), S. 304-22
- van Meer, G. und Holthuis, J. C.:** Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1486** (2000), S. 145-70
- Walter, J.; Urban, J.; Volkwein, C. und Sommer, T.:** Sec61p Independent Degradation of the Tail-Anchored ER-Membrane Protein Ubc6p. *Embo J* (2001) in press
- Wang, E.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Riley, R. T. und Merrill, A. H.:** Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **266** (1991), S. 14486-90
- Weir, M. L.; Klip, A. und Trimble, W. S.:** Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem J* **333** (1998), S. 247-51
- Wells, G. B.; Dickson, R. C. und Lester, R. L.:** Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via de novo synthesis. *J Biol Chem* **273** (1998), S. 7235-43
- Wilhovsky, S.; Gardner, R. und Hampton, R.:** HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell* **11** (2000), S. 1697-708

Wu, W. I.; McDonough, V. M.; Nickels, J. T., Jr.; Ko, J.; Fischl, A. S.; Vales, T. R.; Merrill, A. H., Jr. und Carman, G. M.: Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B1. *J Biol Chem* **270** (1995), S. 13171-8

Yamashita, S. und Nikawa, J.: Phosphatidylserine synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1348** (1997), S. 228-35

Zanolari, B.; Friant, S.; Funato, K.; Sutterlin, C.; Stevenson, B. J. und Riezman, H.: Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19** (2000), S. 2824-33

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AbA	Aureobasidin A
Ade	Adenin
AF	Australifungin
ATP	Adenosintriphosphat
BMH	Bismaleimidohexan
bp	Basenpaar
CDP	Cytosindiphosphat
Cer	Ceramid
ConA	Concanavalin A
COP	Coatomer proteine
CTP	Cytosintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHS	Dihydrosphingosin (Sphinganin)
DHS-P	Dihydrosphingosin-1-Phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMP	Dimethylpimelimidat
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Thyminmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
GFP	„Green fluorescent protein“
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxypiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzym A
HPLC	„High pressure liquid chromatographie“
IPC	Inositol-phosphoryl-ceramid
kDa	Kilodalton

LB	„Luria broth“ Medium für <i>E. coli</i>
LiDS	Lithium Dodecylsulfat
Lys	Lysin
MeOH	Methanol
M(IP) ₂ C	Mannosyl-di-(inositol-phosphoryl)-ceramid
min	Minute
MIPC	Mannosyl-inositol-phosphoryl-ceramid
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propansäure
mRNA	„messenger ribonucleic acid“ Botenribonukleinsäure
Myr	Myriocin
NP40	Nonidet P40
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PA	Phosphatidat, Diacylglycerol-Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“ NaPhosphat/ NaCl Puffer
PC	Phosphatidylcholin
PCR	„Polymerase chain reaction“ Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanol
PHS	Phytosphingosin, 4-Hydroxy-Sphingarin
PHS-P	Phytosphingosin-1-Phosphat
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PS	Phosphatidylserin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	Synthetisches komplettes Minimalmedium (Hefe)
SD	Synthetisches Minimalmedium (Hefe)
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“ Natrium Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Seq.	Sequenzbereich
SSC	„Sodium chlorid/ Sodium citrat buffer“
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA Elektrophoresepuffer
TBT	Tris/ Borat/ Tween 20 Puffer
TCA	„Trichlor acetic acid“ Trichloressigsäure
TLCK	Na-tosyl-Lys-chlormethylketon

Tm	Tunicamycin
TPCK	N ^α -tosyl-Phe-chlormethylketon
trafo	Transformation
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	„unfolded protein response“
wt	Wildtyp
YNB	„Yeast nitrogen base“ Hefe Stickstoffbasis
YPD	Hefe Vollmedium
βME	2-Mercaptoethanol

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Ubiquitinsystem“ am Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt. Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die freundliche und anregende Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter dieser Gruppe, Dr. Thomas Sommer, für die vielfältige Unterstützung meiner Arbeit und insbesondere für die Möglichkeit, diese Aufgabe weiter zu bearbeiten, obwohl sie sich thematisch und methodisch von dem hauptsächlichen Arbeitsgebiet der Arbeitsgruppe entfernt hat.

Von meinen Kollegen in der AG Sommer möchte ich insbesondere Corinna Volkwein und Kathrin Jepsen für die Organisation eines reibungslosen Laborbetriebs und Ernst Jarosch für seine Hilfe beim Umgang mit Computern danken, aber auch allen anderen, die beim Lösen praktischer Probleme geholfen haben oder mich beim Schreiben dieser Arbeit beraten haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der AG Schunck, die mich bei der Lipidanalytik beraten haben und deren Geräte ich für meine Arbeit nutzen durfte.

Einen großen Dank schulde ich meinen Eltern, ohne deren ständige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Persönliche Daten

Name: Jörg Urban
Geburtsdatum: 29. 03. 1968
Geburtsort: Hoyerswerda
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Lebenslauf

1974 - 84 POS Hoyerswerda
1984 - 86 Abitur an der Erweiterten Oberschule Hoyerswerda
1986 - 89 Militärdienst NVA
1989 - 94 Studium der Biochemie an der Humboldt-Universität zu Berlin
1993 - 94 Diplomarbeit am Max Delbrück Centrum in Berlin in der AG Sommer
Thema: "Untersuchungen zur Degradation der Hmg2 im endoplasmatischen Retikulum von *Saccharomyces cerevisiae*"; Diplom mit Prädikat "sehr gut"
1994-2001 Promotion am MDC Berlin in der AG Sommer
Thema: "Untersuchungen zur Regulation des Lipidstoffwechsels in *Saccharomyces cerevisiae*"

Publikationen

Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 379-84.

Walter, J., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2001). Sec61p Independent Degradation of the Tail-Anchored ER-Membrane Protein Ubc6p. *Embo J* in press.

Berlin, den 01.06.2001

Jörg Urban

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 01.06.2001

Jörg Urban